

873 PCT

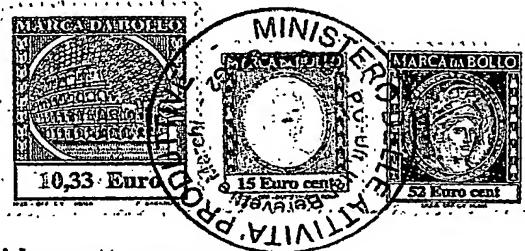


Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI 2003 A 001942.

EP/04/11161

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

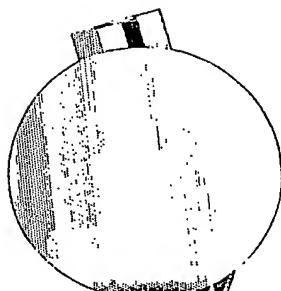
CMA li.....
15 NOV. 2004

BEST AVAILABLE COPY

IL FUNZIONARIO

Giampietro Carlotto

Giampietro Carlotto



AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione INDENA S.p.A.Residenza Milanocodice 2) Denominazione Residenza codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Bianchetti Giuseppe ed altricod. fiscale denominazione studio di appartenenza Bianchetti Bracco Minoja s.r.l.via Rossinin. città Milanocap 20122(prov) MILC. DOMICILIO ELETTIVO destinatario via n. città cap (prov)

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) gruppo/sottogruppo / "DNA codificante p185^{neu} e suoi usi terapeutici"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI NO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

SE ISTANZA: DATA / / N° PROTOCOLLO

cognome nome

1) Amici Augusto3) Forni Guido2) Cavallo Federica4) Marchini Cristina

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

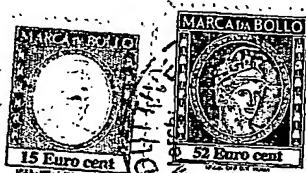
allegato

S/R

SCIOLGIMENTO RISERVE

Data N° Protocollo 1) n. data / / n. 2) n. data / / n. G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI



1033 Euro

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) PROV n. pag. 51

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

Doc. 2) PROV n. tav. 14

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

Doc. 3) RIS

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

Doc. 4) RIS

designazione inventore

Doc. 5) RIS

documenti di priorità con traduzione in italiano

Doc. 6) RIS

autorizzazione o atto di cessione

Doc. 7) RIS

nominativo completo del richiedente

8) attestato di versamento, totale Euro Quattrocentosettantadue/56#

obbligatorio

COMPILATO IL 09/10/2003FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I) Banfi PaoloCONTINUA SI/NO NODEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SICAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI MILANOMILANOcodice 155VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA MT2003A 001942

Reg. A.

L'anno DUEMILATREl'anno NOVEdel mese di OTTOBREIl(I) richiedente(I) sopraindicato(I) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, affredato di 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE IL RAPPRESENTANTE, INFORMATO DEL CONTENUTO DELLA CIRCOLARE N. 423 DEL 01.03.2001, EFFETTUANDO IL DEPOSITO CON RISERVA DI LETTERA D'INCARICO.

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE/DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

MI2003A00792

REG. A

NUMERO BREVETTO

DATA DI DEPOSITO

09/10/2003

DATA DI RILASCIO

11/11/2003

D. TITOLO

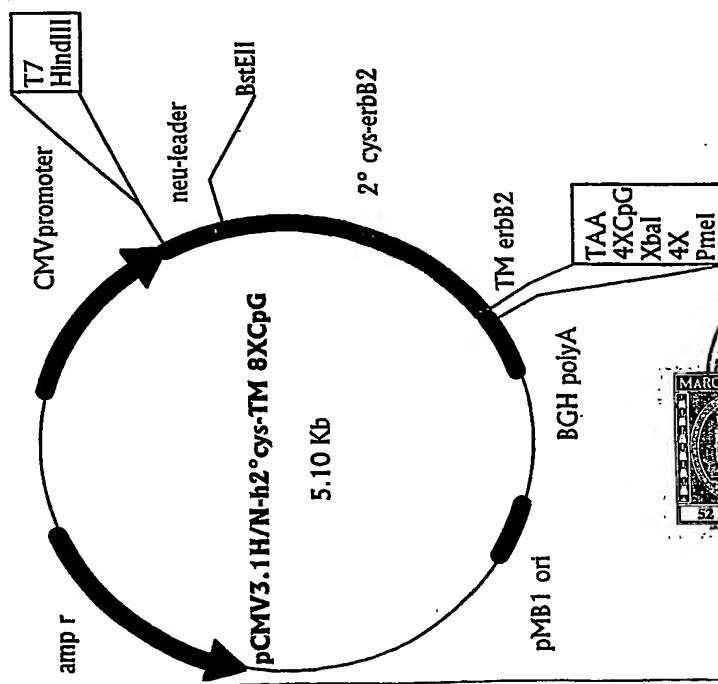
"DNA codificante p185^{neu} e suoi usi terapeutici"

E. RIASSUNTO

Si descrivono plasmidi contenenti sequenze codificanti diversi frammenti dell'oncoproteina p185^{neu}, in grado di indurre una risposta immunitaria contro tumori esprimenti oncogeni della famiglia ErbB, e loro composizioni farmaceutiche.

M. DISEGNO

FIGURA 1

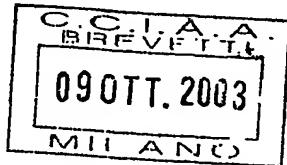


18 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

/mc "DNA CODIFICANTE p185^{neu} E SUOI USI TERAPEUTICI"

a nome : INDENA S.p.A.

con sede in: Milano



* * *

MI 2003 A 001942

La presente invenzione riguarda vettori plasmidici contenenti sequenze codificanti la p185^{neu} e il loro uso nella vaccinazione a DNA contro i tumori. I plasmidi secondo l'invenzione contengono sequenze codificanti diversi frammenti dell'oncoproteina p185^{neu} umana o di ratto e sono in grado di indurre una risposta immunitaria umorale o cellulo-mediata contro tumori esprimenti oncogeni della famiglia ErbB.

L'invenzione riguarda inoltre composizioni farmaceutiche contenenti tali plasmidi e il loro uso nel trattamento preventivo o terapeutico di tumori esprimenti p185^{neu}.

Sfondo dell'invenzione

La proteina p185^{neu}, uno dei più studiati antigeni tumorali, ha suscitato un grande interesse come bersaglio di immunoterapie contro il cancro grazie alla sua presenza sulla membrana delle cellule di alcuni fra i più comuni carcinomi umani. La p185^{neu} è un recettore di membrana codificato nel ratto dal proto-oncogene Her-2/neu ed appartenente alla famiglia dei Recettori Tiroシン Chinasici (RTKs) di classe I, che comprende anche il Recettore del Fattore di crescita epidermico EGF-R (ErbB-1) ed altri recettori ad esso correlati (ErbB-3, ErbB-4) critici per la proliferazione e il differenziamento cellulare (Hynes and Stern, 1994 BBA 1198:165), ed attualmente oggetto di grande interesse biologico e clinico. Questo recettore è costituito da tre

domini ben distinti: extracellulare, transmembrana e intracitoplasmatico. La p185^{neu} è coinvolta nella complessa rete dei meccanismi di trasmissione intracellulare del segnale e di comunicazione intercellulare che regola i processi di proliferazione e differenziamento (Boyle 1992 Curr. Op. Oncol. 4:156). L'oncogene *neu* deve il suo nome al neuroglioblastoma di ratto indotto chimicamente da cui è stato inizialmente isolato. Questa forma attivata di *neu* presenta una singola mutazione puntiforme che risulta nel cambiamento di una A in T e nella conseguente sostituzione del residuo di Valina in posizione 664 della p185^{neu} con un residuo di Acido Glutammico (Val664Glu) (Bargmann et al. 1986, Cell 45:649).

Anche l'omologo umano di *neu*, ErbB-2, è stato isolato e caratterizzato ed è stato dimostrato che sia il recettore HER2/neu di ratto che l'ErbB2 dell'uomo presentano una significativa omologia con EGFR (Coussens et al. 1985, Sciente 230:1132; Yamamoto et al. 1986, Nature 319:230). Mentre nel ratto un'alterazione qualitativa (mutazione genica) è alla base della costitutiva attivazione dei recettori tramite dimerizzazione, nei tumori umani ErbB-2 positivi, si riscontra soprattutto una marcata alterazione di tipo quantitativo dell'espressione dell'oncogene (Di Marco et al. 1990, Mol. Cell. Biol. 10: 3247; Klapper et al., 2000, Adv Cancer Res, 77:25), sebbene, in rari casi, siano state individuate mutazioni puntiformi attivanti, o aberranti meccanismi di splicing (Kwong et al., 1998, Mol Carcinog, 23:62; Xie et al., 2000, J Natl Cancer Inst, 92:412). L'effetto complessivo è, tutto sommato, assimilabile: l'amplificazione genica e l'aumento del livello di trascrizione portano ad un eccesso della molecola recettoriale p185^{neu} sulla membrana, con conseguente aumento dei dimeri attivi, trasducenti positivi segnali di crescita all'interno

della cellula, anche in questo caso in modo ligando-indipendente. Recentemente è stata pubblicata la struttura cristallografica della regione extracellulare della p185^{neu} umana e di ratto ed è stato evidenziato che questa proteina è caratterizzata da una conformazione fissa, che le consente, pur non legandosi direttamente ad alcun ligando, di interagire con gli altri recettori ErbB, dimerizzare ed innescare la trasduzione del segnale di proliferazione (Cho HS et al. 2003, *Nature* 421:756).

Nell'uomo, in condizioni normali, la p185^{neu} è coinvolta nell'organogenesi e nella crescita epiteliale, è espressa ad elevati livelli durante la formazione della placenta e lo sviluppo fetale, mentre è presente a livelli appena rilevabili in molti tessuti adulti (Press et al. 1990, *Oncogene* 5:953). Molti studi hanno dimostrato che l'iperespressione della p185^{neu} nell'uomo è associata al processo neoplastico e correla con caratteristiche peggiori di aggressività del tumore. L'iperespressione della p185^{neu} è stata descritta nel caso di adenocarcinomi del polmone (Kern et al. 1986, *Cancer Res.* 50:5184), del colon (Cohen et al. 1989, *Oncogene* 4:81), dell'ovaio (Slamon et al. 1989, *Science* 244:707) e in una elevata percentuale di carcinomi mammari umani (Slamon et al. 1989, *Science* 244:707; Jardines et al. 1993, *Pathobiology* 61:268).

Le proprietà fondamentali che rendono la p185^{neu} un ottimo bersaglio della vaccinazione con plasmidi sono: a) il suo diretto coinvolgimento nella crescita cellulare e nella carcinogenesi, per cui le varianti clonali che, per instabilità genetica del tumore, perdono l'espressione di questo antigene perdono anche la loro tumorigenicità; b) la sua espressione sulla membrana plasmatica, fatto questo che la rende riconoscibile da parte degli anticorpi

anche nelle cellule tumorali che perdono l'espressione delle glicoproteine del sistema maggiore di istocompatibilità (Lollini P. and Forni G. 2003, Trends Immunol. 24: 62).

Studi condotti sia su modelli di topi transgenici per l'oncogene Her-2/neu attivato di ratto (che spontaneamente sviluppano tumori mammari p185^{neu} positivi) che su modelli murini basati sull'impiego di linee tumorali trapiantabili p185^{neu} positive, hanno dimostrato che la prevenzione e la cura delle lesioni preneoplastiche è un obiettivo raggiungibile. In particolare, in esperimenti di prevenzione dello sviluppo di tumori mammari in topi transgenici per l'Her-2/neu attivato di ratto, abbiamo dimostrato che il plasmide che codifica i domini extracellulare e transmembrana della p185^{neu} di ratto è in grado di indurre una protezione *in vivo* più efficace rispetto al plasmide che codifica l'intera p185^{neu} di ratto e a quello che ne codifica il solo dominio extra-cellulare (antigene secreto) (Amici A. et al. 2000, Gene Ther., 7: 703; Rovero S. et al. 2000, J. of Immunol., 165: 5133). Dati analoghi sono stati riportati da Chen et al. (1998, Cancer Res 58:1965). Altri Autori hanno dimostrato che plasmidi codificanti la proteina p185^{neu}, intera oppure intera ma mutata in modo da eliminare la sua attività tirosin chinasica, sono efficaci nel prevenire l'insorgenza di tumori a seguito dell'inoculo di cellule p185^{neu} positive (Wei WZ et al. 1999, Int. J. Cancer 81: 748). Molti riguardi sono stati plasmidi privi del segnale responsabile del processamento attraverso il reticolo endoplasmatico (leader) che quindi determinano la localizzazione citoplasmatica dell'antigene p185^{neu} si sono rivelati altrettanto efficaci. La protezione indotta dai diversi plasmidi era mediata prevalentemente da una risposta immunitaria di tipo umorale nel caso dell'espressione in membrana

della p185^{neu}, e prevalentemente da una risposta immunitaria mediata dai linfociti T nel caso della localizzazione citoplasmatica della p185^{neu} (Pilon SA et al. 2001, J. of Immunol. 167: 3201). Tuttavia, la vaccinazione combinata utilizzando sia i plasmidi che determinavano l'espressione della p185^{neu} nel citoplasma che sulla membrana risultava comunque più efficace nella protezione contro la crescita tumorale (Piechocki MP et al. 2001, J. Immunol. 167: 3367). Quindi potrebbe essere particolarmente importante il bilanciamento tra i diversi meccanismi effettori della risposta immunitaria (Reilly et al., 2001, Cancer Res. 61: 880). Inoltre - si è visto che la vaccinazione con plasmidi codificanti i domini extracellulare e transmembrana della p185^{neu} di ratto, è in grado di eradicare masse tumorali di due millimetri di diametro, sviluppatesi in seguito ad inoculo con cellule iperesprimenti la p185^{neu}, coinvolgendo una serie di meccanismi effettori del sistema immunitario (cellule T helper e T killer, anticorpi, macrofagi, neutrofili, cellule natural killer, recettori Fc, IFN gamma e perforine) che in modo coordinato contribuiscono al rigetto del tumore (Curcio C. et al. 2003, J. Clin. Invest. 111: 1161).

Descrizione dell'invenzione

Sono stati preparati diversi costrutti codificanti frammenti della proteina p185^{neu} umana o "chimerica" uomo/ratto, successivamente inseriti in vettori plasmidici e utilizzati in esperimenti d'immunizzazione volti a prevenire la progressione tumorale nei topi. Per la costruzione dei plasmidi sono stati prodotti frammenti della proteina p185^{neu} contenenti il dominio transmembrana e porzioni del dominio extracellulare di lunghezza decrescente, utilizzando la sequenza umana codificata dall'oncogene ErbB2 o

sostituendo parti di questa con sequenze omologhe del cDNA dell'Her-2/neu di ratto, in modo da creare plasmidi chimera uomo/ratto.

I plasmidi così prodotti sono stati valutati in esperimenti di vaccinazione di topi inoculati con cellule tumorali iper-esprimenti p185^{neu} umana. Ciascun plasmide era in grado di indurre selettivamente risposte immunitarie di tipo diverso. In particolare, i plasmidi contenenti forme tronche di p185^{neu} inducevano una reattività antitumorale mediata da linfociti T killer e helper, mentre i plasmidi chimera inducevano una risposta anticorpale sia verso la p185^{neu} umana che verso la p185^{neu} di-ratto.

Sulla base dei risultati degli esperimenti in vivo sono stati selezionati i plasmidi in grado di indurre una forte risposta immunitaria sia di tipo anticorpale sia mediata da linfociti T killer ed helper. Tali plasmidi, oggetto della presente invenzione, contengono una sequenza codificante per un frammento di p185^{neu} scelta dal gruppo costituito da SEQ ID N. 1 – 14 (le sequenze di riferimento per p185^{neu} umana e di ratto sono depositate in Gene Bank con accession number M11730 e, rispettivamente, X03362).

Le sequenze codificanti p185^{neu} secondo l'invenzione possono essere inserite in qualunque vettore plasmidico idoneo alla somministrazione umana. Oltre alle sequenze codificanti sopra indicate, i plasmidi possono contenere elementi funzionali per il controllo della trascrizione, in particolare un promotore localizzato a monte della sequenza codificante, preferibilmente il promotore CMV, sequenze di inizio e fine della trascrizione, marker di selezione, quali il gene per la resistenza all'ampicillina o alla kanamicina, motivi CpG, un sito di poliadenilazione ed eventualmente enhancer o attivatori della trascrizione. Gli elementi deputati al controllo della

trascrizione devono essere compatibili con l'uso del vettore nell'uomo. In una realizzazione preferita, i plasmidi dell'invenzione contengono almeno 4 motivi CpG, preferibilmente almeno 8, fino ad un massimo di 80. I motivi CpG (ATAATCGACGTTCAA), di origine batterica, inducono i macrofagi a secernere IL-12, che a sua volta induce la secrezione di IFN gamma da parte delle cellule natural killer, attivando così una risposta mediata dai linfociti T helper (Chu R.S. et al. 1997, J. Exp. Med., 186: 1623). Pertanto, l'inserimento dei motivi CpG all'interno delle sequenze plasmidiche potenzia la risposta immunitaria indotta dall'antigene codificato dal plasmide.

Secondo un altro aspetto, l'invenzione è diretta a una composizione farmaceutica contenente un plasmide come sopra definito insieme a veicoli ed eccipienti farmaceuticamente accettabili. Le composizioni farmaceutiche, in una forma idonea alla somministrazione parenterale, preferibilmente in forma di soluzione iniettabile, sono preferibilmente utilizzate in tecniche di vaccinazione a DNA. I principi e i metodi per la vaccinazione a DNA sono noti all'esperto del settore e sono descritti per esempio in Liu MA 2003; J Int Med 253: 402.

I plasmidi secondo l'invenzione, opportunamente formulati, vengono utilizzati nel trattamento preventivo o terapeutico di soggetti a rischio di sviluppo di tumori p185^{neu} positivi, o di pazienti portatori di tumori primari, metastasi o recidive di tumori p185^{neu} positivi. La prevenzione può essere primaria, quando il tumore non è ancora manifesto, secondaria, quando il tumore è nelle fasi iniziali come lesione preneoplastica, o terziaria, in caso di recidiva tumorale o di processo metastatico. I tumori che possono beneficiare del trattamento con i plasmidi dell'invenzione sono quelli di origine epiteliale,

in particolare adenocarcinoma polmonare, ovarico e carcinoma mammario, più in generale i tumori esprimenti la p185^{neu}.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Costruzione dello scheletro plasmidico pCMV3.1

Per poter costruire i plasmidi codificanti frammenti della p185^{neu} umana e i plasmidi chimera abbiamo utilizzato uno scheletro plasmidico denominato pCMV3.1. Su questo nostro scheletro plasmidico sono stati inseriti i frammenti derivati dal cDNA del protooncogene ErbB-2 umano e dal cDNA del protooncogene Her-2/neu di ratto. Questo scheletro plasmidico pCMV3.1 è stato ottenuto partendo dal plasmide usato per l'espressione negli eucarioti pcDNA3.1 (Invitrogen, Milano, Italia), eliminando con gli enzimi di restrizione DraIII (nt1531) e BsmI (nt3189) un frammento di 1658 bp contenente l'origine di replicazione f1, l'origine di replicazione e l'early promoter di SV40, il gene che codifica la resistenza alla neomicina ed il segnale di poliadenilazione di SV40. Lo scheletro plasmidico che ne risulta (il pCMV3.1) presenta diversi vantaggi rispetto al pcDNA3.1 originale. Infatti, sia la riduzione delle dimensioni a 3900 bp sia l'eliminazione della sequenza codificante i geni irrilevanti al nostro scopo contribuiscono all'aumento dell'efficienza della trasfezione *in vivo*.

Costruzione del plasmide pCMV3.1erbB2

All'interno del sito multiplo di clonaggio dello scheletro plasmidico pCMV3.1 è stato inserito il cDNA di ErbB2 umano, ottenuto dal plasmide pSVerbB2, nei siti di restrizione HindIII e XbaI. Questo plasmide costituisce il punto di partenza per la costruzione dei plasmidi esprimenti la p185^{neu} tronca e dei plasmidi chimera.



*Costruzione dei plasmidi contenenti la sequenza 4XCpG:
pCMV3.1hECD-TM-4CpG e pCMV3.1hECD-TM-4noCpG*

Partendo dal plasmide pCMV3.1-erbB2 ed eliminando la sequenza che codifica il dominio intracitoplasmatico, abbiamo preparato due plasmidi che codificano entrambi le regioni extracellulare e transmembrana del protooncogene ErbB2. La procedura seguita ha previsto prima l'analisi di restrizione per identificare i siti unici presenti nella sequenza nucleotidica del cDNA di ErbB2. Dall'analisi di restrizione è stato individuato un sito unico riconosciuto dall'enzima AccIII presente (nt 2195) circa 20 bp dopo il termine del dominio transmembrana. L'eliminazione del domino intracitoplasmatico è stata possibile utilizzando l'enzima AccIII presente come sito unico di restrizione e l'enzima XbaI. Per inserire di nuovo all'estremità 3' del cDNA dell'ECD-TM di ErbB2 la tripletta nucleotidica TAA, riconosciuta come segnale di stop della traduzione, abbiamo usato due sequenze sintetiche composte da due oligonucleotidi senso (oligonucleotide #1, #3) ed antisenso (oligonucleotide #2, #4) con alle proprie estremità i siti di restrizione AccIII e XbaI. In queste sequenze sintetiche da noi usate sono presenti anche quattro sequenze ripetute CpG e noCpG. La sequenza noCpG funge da controllo sperimentale negativo. Questi due nuovi plasmidi sono stati nominati pCMV3.1hECD-TM-4CpG e pCMV3.1hECD-TM-4noCpG.

*Costruzione dei plasmidi contenenti la sequenza 8XCpG:
pCMV3.1H/NhECD-TM-8CpG e pCMV3.1H/NhECD-TM-8noCpG*

Per aggiungere ulteriori stimoli immunitari aspecifici abbiamo costruito un nuovo scheletro plasmidico contenente 4 sequenze immunostimolatorie CpG denominato pCMV3.1 H/N-4CpG. A tale scopo abbiamo modificato il

pCMV3.1 per eliminare uno dei due siti di restrizione per l'enzima PmeI ed invertire i siti di restrizione per HindIII e NheI presenti sul suo sito multiplo di clonaggio grazie ad una sequenza sintetica costituita da due oligonucleotidi senso (oligonucleotide #5) ed antisenso (oligonucleotide #6). In questo nuovo plasmide, chiamato pCMV3.1 H/N, sono state inserite due sequenze sintetiche, costituite da due oligonucleotidi senso (oligonucleotide #7, #9) ed antisenso (oligonucleotide #8, #10), contenenti quattro ripetizioni per le sequenze CpG e noCpG nei siti unici di restrizione XbaI e PmeI, ottenendo così il pCMV3.1 H/N-4CpG e 4noCpG. Successivamente i frammenti di DNA hECD-TM-4CpG e hECD-TM-4noCpG sono stati inseriti rispettivamente in pCMV3.1 H/N-4CpG ed in pCMV3.1 H/N-4noCpG, ottenendo così due nuovi plasmidi chiamati pCMV3.1H/N-hECD-TM-8CpG e pCMV3.1H/N-hECD-TM-8noCpG.

*Costruzione del plasmide contenente la sequenza del secondo dominio cisteinico e del dominio transmembrana della p185^{neu} umana:
pCMV3.1H/Nh2°cysECD-TM-8CpG*

Il dominio extracellulare della p185^{neu} umana è caratterizzato da due zone ricche in cisteine, chiamate appunto 1° e 2° sub-dominio cisteinico (1°cys e 2°cys). A differenza della sequenza del cDNA di ratto in cui è presente un solo sito BstEII (nt1250) nel dominio extracellulare ed è posto nella regione nucleotidica che separa 1°cys da 2°cys, la sequenza del cDNA del dominio extracellulare di ErbB2 presenta due siti di restrizione per BstEII: oltre al sito in posizione identica a quello di ratto (nt1372), un altro sito BstEII (nt963) è presente nella porzione che codifica 1°cys del dominio extracellulare. Digerendo il plasmide pCMV3.1H/NhECD-TM-8CpG con HindIII e BstEII è

stato possibile ottenere un frammento di DNA costituito dal 2°cys del dominio extracellulare, il dominio transmembrana, la sequenza 8CpG ed il plasmide pCMV3.1H/N. È stato poi aggiunto il segnale per la secrezione attraverso il reticolo endoplasmatico della p185^{neu} di ratto, ottenuto mediante amplificazione enzimatica del DNA (reazione di PCR) utilizzando un oligonucleotide senso costituito dal primer T7 (oligonucleotide #11) che riconosce il promotore della T7 RNA polimerasi, presente all'inizio del sito multiplo di clonaggio del pCMV3.1H/N, ed un oligonucleotide antisenso (oligonucleotide #12) con alla sua estremità il sito BstEII. Dopo purificazione, digestione enzimatica del frammento amplificato con gli enzimi di restrizione HindIII e BstEII e conseguente clonaggio è stato ottenuto il pCMV3.1H/Nh2°cys-TM-8CpG (Fig. 1). Questo plasmide è stato usato in esperimenti di vaccinazione per paragonarlo al pCMV3.1 H/NhECD-TM-8CpG. È stato successivamente preparato un cDNA chimera che codifica la proteina di fusione tra il 2°cys ed il dominio trasmembrana (nt 1372-nt 2204) della sequenza umana e il 1°cys (nt 1-nt 1250) della sequenza di ratto. La ricostituzione dell'intera sequenza proteica ottenuta da una porzione derivante dal cDNA di ratto fusa ad una porzione del cDNA umano aumenta in modo vantaggioso la risposta immunitaria.

Costruzione del plasmide chimera contenente la sequenza del primo dominio cisteinico della p185^{neu} di ratto e del secondo dominio cisteinico e del dominio transmembrana della p185^{neu} umana: pCMV3.1H/N-r1°cys-h2°cysTM-8CpG

A differenza della sequenza del cDNA di ratto in cui è presente un solo sito BstEII (nt1250) nel dominio extracellulare posto nella regione nucleotidica che separa la prima e la seconda zona ricca in cisteine, la sequenza del cDNA

del dominio extracellulare di ErbB2 presenta due siti di restrizione per BstEII: il sito in posizione 1372 (nt) come nella sequenza di ratto ed un altro sito in posizione 963 (nt), situato quindi nella porzione di sequenza che codifica la 1°cys del dominio extracellulare. Grazie al sito BstEII presente nella stessa posizione sia nel cDNA di ratto (1250nt) sia nel cDNA umano (1372nt) è stato possibile costruire un plasmide capace di codificare un prodotto di fusione tra il 1°cys di ratto e il 2°cys umano. Infatti digerendo il pCMV3.1H/N-h2°cysTM-8CpG con gli enzimi di restrizione HindIII e BstEII è stato possibile eliminare il frammento di DNA che codifica il segnale di secrezione della p185^{neu} di ratto ed al suo posto è stata inserita la sequenza nucleotidica codificante il 1°cys di ratto ottenuta digerendo con gli stessi enzimi il pCMV3.1rECD-TM-4CpG. Il prodotto proteico, espresso dal plasmide pCMV3.1H/N-r1°cys-h2°cysTM-8CpG (Fig. 2), è quindi composto da una porzione di 412 aa della p185^{neu} di ratto e da una di 274 aa della p185^{neu} umana. Questo nuovo plasmide, il pCMV3.1H/Nr1°cys-h2°cysTM-8CpG, è stato usato in esperimenti di vaccinazione per paragonarlo al pCMV3.1H/N-hECD-TM-8CpG. Sorprendentemente, il plasmide che codifica la proteina chimera induce nei topi di ratto una protezione totale (100%) verso tumori che esprimono la p185^{neu} umana (Tabella). Questa protezione è eguale a quella indotta dal pCMV3.1H/N-hECD-TM-8CpG. Inoltre, l'analisi dei sieri dei topi vaccinati con entrambi i plasmidi ha evidenziato un titolo anticorpale simile verso la p185^{neu} umana.

Plasmidi i in grado di codificare frammenti decrescenti del dominio extracellulare e transmembrana della p185^{neu} umana

Successivamente siamo passati alla costruzione di sette plasmidi che codificano frammenti decrescenti del dominio extracellulare e transmembrana

della p185^{neu} umana. Questi plasmidi sono stati denominati: pCMV3.1H/NhECD1-TM-8CpG (-70 aa), pCMV3.1H/NhECD2-TM-8CpG (-150 aa), pCMV3.1H/NhECD3-TM-8CpG (-230 aa), pCMV3.1H/NhECD4-TM-8CpG (-310 aa), pCMV3.1H/NhECD5-TM-8CpG (-390 aa), pCMV3.1H/NhECD6-TM-8CpG (-470 aa) e pCMV3.1H/NhECD7-TM-8CpG (-550 aa).

Il frammento codificato dal primo di questi plasmidi è di 70 aa (delezione di 360 bp) più corto. Tutti gli altri sono, via a via, più corti di 80 aa (delezioni di 240 bp).

Questi frammenti sono stati ottenuti mediante amplificazione enzimatica del DNA, utilizzando sette diversi oligonucleotidi senso con all'estremità il sito di restrizione NheI (oligonucleotidi #13-#19) e un oligonucleotide antisenso (oligonucleotide #20) capace di riconoscere il sito chiamato "pcDNA3.1/BGH Reverse priming site" (830-850 nt) presente all'estremità 3' del sito multiplo di clonaggio del pCMV3.1. In seguito a digestione enzimatica con gli enzimi di restrizione NheI e PmeI, i prodotti di amplificazione sono stati clonati all'interno del plasmide pCMV3.1H/N-neu leader, precedentemente ottenuto inserendovi il segnale di secrezione attraverso il reticolo endoplasmatico della p185^{neu} di ratto nei siti di restrizione HindIII ed NheI. Il frammento di DNA relativo al segnale di secrezione della p185^{neu} di ratto è stato ottenuto mediante amplificazione enzimatica del DNA usando come oligonucleotide senso il primer T7 (oligonucleotide #11) e un oligonucleotide antisenso (oligonucleotide #21) con all'estremità il sito NheI. Il frammento amplificato dopo purificazione e digestioni di restrizione con HindIII e NheI è stato clonato nel plasmide

pCMV3.1H/N digerito con gli stessi enzimi, ottenendo così il pCMV3.1H/N-neu leader. Le diverse forme tronche della p185^{neu} umana codificate da questi plasmidi, grazie alla presenza del segnale di secrezione attraverso il reticolo endoplasmatico della p185^{neu} di ratto, dovrebbero essere espressi in membrana. I plasmidi codificanti le prime quattro forme tronche (pCMV3.1H/NhECD1-TM-8CpG (Fig. 3), pCMV3.1H/NhECD2-TM-8CpG (Fig. 4), pCMV3.1H/NhECD3-TM-8CpG (Fig. 5), pCMV3.1H/NhECD4-TM-8CpG (Fig. 6) così come il plasmide pCMV3.1H/NhECD-TM-8CpG, che funge da controllo, proteggono il 100% dei topi vaccinati verso un inoculo letale di cellule tumorali che esprimono la p185^{neu} umana (Tabella). Il plasmide pCMV3.1H/NhECD5-TM-8CpG (Fig. 7) protegge il 60% degli animali (Tabella), mentre i plasmidi pCMV3.1H/NhECD6-TM-8CpG e pCMV3.1H/NhECD7-TM-8CpG (Fig. 8, 9), non hanno nessun effetto protettivo verso un inoculo letale di cellule tumorali che esprimono la p185^{neu} umana (Tabella). I prodotti proteici espressi dai diversi plasmidi non sono secreti attraverso il reticolo endoplasmatico. La mancanza di sequenze consensus, importanti per la glicosilazione e necessarie per il loro processamento attraverso l'apparato del Golgi, o cambiamenti conformazionali dovuti alle delezioni di amminoacidi al termine -NH₂, potrebbero spiegare l'assenza dei prodotti proteici in membrana. Quindi, per verificare ulteriormente la corretta espressione sulla membrana plasmatica delle diverse forme tronche del dominio extracellulare e transmembrana della p185^{neu} umana sono stati generati dei nuovi plasmidi capaci di codificare proteine di fusione caratterizzate dall'epitopo myc all'estremità -NH₂ terminale. Tali proteine ricombinanti sono riconosciute da un anticorpo

monoclonale anti-myc e quindi è possibile analizzare la loro espressione e la loro localizzazione al microscopio confocale. Dapprima è stato creato un nuovo plasmide in grado di codificare il segnale di secrezione attraverso il reticolo endoplasmatico di ratto (neu leader) e l'epitopo myc. Il clonaggio è stato effettuato usando una sequenza sintetica costituita da un oligonucleotide senso (oligonucleotide #22) ed uno antisenso (oligonucleotide #23) con alle due estremità il sito NheI. Il sito NheI presente in posizione 5' è stato mutato in modo che, una volta avvenuto correttamente il processo di ligazione, non venisse più riconosciuto dall'enzima. In questo modo abbiamo ottenuto il pCMV3.1H/Nneuleader-epitopo myc. All'interno di questo plasmide, nei siti di restrizione NheI e PmeI, sono state clonate le sequenze codificanti le forme tronche della p185^{neu} umana. Con questi plasmidi sono stati transfettati *in vitro*, mediante lipofectamina 2000 (Invitrogen, Milano, Italia), i fibroblasti 3T3 NIH. Dopo 48 ore le cellule transfettate sono state analizzate al microscopio confocale, utilizzando l'anticorpo monoclonale anti-myc FITC coniugato (Sigma-Aldrich Srl, Milano, Italia). È stato così dimostrato che tutti i plasmidi per le forme tronche codificano per prodotti proteici localizzati solo a livello citoplasmatico. Parallelamente i fibroblasti 3T3 NIH sono stati trasfettati con il plasmide pCMV3.1H/NhECD-TM-8CpG ed analizzati al microscopio confocale usando l'anticorpo monoclonale c-erbB2/c-neu Ab-3 (Oncogene, Boston, MA) come anticorpo primario e un anticorpo secondario anti-mouse FITC coniugato (PharMigen, San Diego, CA). È stato così evidenziato che l'ECD-TM umano viene espresso in membrana. I risultati ottenuti, usando i primi quattro plasmidi descritti precedentemente (pCMV3.1H/NhECD1-TM-8CpG, pCMV3.1H/NhECD2-TM-8CpG,

pCMV3.1H/NhECD3-TM-8CpG, pCMV3.1H/NhECD4-TM-8CpG), dimostrano che una risposta di tipo cellulare è sufficiente nella prevenzione antitumorale. Tuttavia si sa che la contemporanea attivazione della risposta cellulare e di quella umorale è necessaria per una terapia più efficace (Rielly et al., 2001, *Cancer Res* 61:880). Come è stato già descritto nel paragrafo precedente, la proteina chimera codificata dal plasmide pCMV3.1H/N-r1°cys-h2°cysTM-8CpG è in grado di proteggere il 100% degli animali vaccinati ed è capace di indurre nei topi una forte risposta umorale.

Plasmidi chimera in grado di codificare cinque diverse p185^{neu} chimera uomo-ratto

Per la costruzione dei plasmidi codificanti le proteine chimera sono stati scelti il pCMV3.1H/NhECD1-TM-8CpG, il pCMV3.1H/NhECD2-TM-8CpG, il pCMV3.1H/NhECD3-TM-8CpG ed il pCMV3.1H/NhECD4-TM-8CpG. Questi quattro plasmidi proteggono il 100% dei topi vaccinati verso un inoculo letale di cellule tumorali che esprimono la p185^{neu} umana. È stato scelto anche un quinto plasmide di partenza, il pCMV3.1H/NhECD5-TM-8CpG anche se protegge solo il 60% dei topi vaccinati, perché la proteina codificata da questo plasmide differisce solo di 17 aa rispetto a quella codificata dal pCMV3.1H/Nh2°cysECD-TM-8CpG (275 aa) che invece protegge soltanto il 20% dei topi vaccinati. È possibile ipotizzare che la sequenza peptidica di 17 aa, che costituisce la differenza tra le due forme proteiche codificate da questi plasmidi, corrisponda ad un epitopo importante per l'induzione di una efficace risposta immunitaria.

I frammenti di DNA che codificano le porzioni della p185^{neu} di ratto da inserire sono stati ottenuti mediante amplificazione enzimatica del DNA. Per

amplificare questi tratti di cDNA sono stati usati sei oligonucleotidi, di cui il senso è uguale per tutti e corrisponde al primer di T7 (oligonucleotide #11) mentre i cinque antisenso sono stati disegnati per riconoscere il cDNA di ratto nelle opportune posizioni ed hanno alle loro estremità il sito di restrizione per NheI (oligonucleotidi #24-#28). Dopo purificazione e digestione con gli enzimi di restrizione HindIII e NheI, i frammenti amplificati sono stati inseriti nei plasmidi corrispondenti (pCMV3.1H/NhECD1-TM-8CpG, pCMV3.1H/NhECD2-TM-8CpG, pCMV3.1H/NhECD3-TM-8CpG, pCMV3.1H/NhECD4-TM-8CpG pCMV3.1H/NhECD5-TM-8CpG), digeriti con gli stessi enzimi di restrizione. In questo modo abbiamo ottenuto cinque nuovi plasmidi in grado di codificare proteine chimera di 689 aa, di cui 2 aa (Val-Ser) appartengono al sito di restrizione NheI usato per la congiunzione tra il DNA di ratto e quello umano. La presenza di questi due aa rende eteroclitiche sia le porzioni umane che quelle di ratto.

Le proteine chimera differiscono per porzioni decrescenti della p185^{neu} umana e per porzioni crescenti della p185^{neu} di ratto. Il plasmide pCMV3.1H/Nr73-hECD1-TM-8CpG (Fig. 10) codifica 73 aa del dominio extracellulare della p185^{neu} di ratto e 614 aa della p185^{neu} umana. Il plasmide pCMV3.1H/Nr153-hECD2-TM-8CpG (Fig. 11) codifica 153 aa del dominio extracellulare della p185^{neu} di ratto e 534 aa della p185^{neu} umana. Il plasmide pCMV3.1H/Nr233-hECD3-TM-8CpG (Fig. 12) codifica 233 aa del dominio extracellulare della p185^{neu} di ratto e 454 aa della p185^{neu} umana. Il plasmide pCMV3.1H/Nr313-hECD4-TM-8CpG (Fig. 13) codifica 313 aa del dominio extracellulare della p185^{neu} di ratto e 374 aa della p185^{neu} umana. Il plasmide pCMV3.1H/Nr393-hECD5-TM-8CpG (Fig. 14) codifica 393 aa del dominio

extracellulare della p185^{neu} di ratto e 294 aa della p185^{neu} umana. La prova indiretta dell'espressione in membrana delle p185^{neu} chimera uomo/topo codificate da questi plasmidi è stata ottenuta immunizzando i topi con i cinque nuovi plasmidi e con il pCMV3.1H/N-r1°cys-h2°cysTM-8CpG come controllo positivo. I sieri di tutti i topi vaccinati presentano anticorpi specifici contro la p185^{neu} umana. Inoltre, gli animali vaccinati con i plasmidi codificanti le cinque diverse proteine chimera sono anche protetti verso un inoculo letale di cellule tumorali che esprimono la p185^{neu} umana.

ESEMPI

Esempio 1 - costruzione del plasmide pCMV3.1H/N-r1°cys-h2°cysTM-8CpG

Per costruire il plasmide chimera pCMV3.1H/N-r1°cys-h2°cysTM-8CpG siamo partiti dal plasmide pCMV-ECD-TM che esprime i domini extracellulare e transmembrana della p185^{neu} di ratto (Amici et al 2000, Gene Ther., 7: 703). Il pCMV-ECD-TM è stato digerito con gli enzimi di restrizione HindIII e XbaI (BioLabs, Beverly, MA) per separare l'inserto dallo scheletro plasmidico.

Digestione di restrizione con l'enzima HindIII:

DNA plasmidico (1 µg/µl)	10 µl
tampone di restrizione 10X (NEB2)	10 µl
HindIII (10U/µl)	5 µl
H ₂ O	<u>75 µl</u>
	100 µl volume finale

La miscela è stata incubata a 37°C per 4 ore e il prodotto di digestione è stato controllato mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% usando

come controlli un marcatore di peso molecolare ed il plasmide non digerito.

Una volta accertata la linearizzazione del plasmide il DNA è stato precipitato aggiungendo alla miscela 1/10 del volume di NaAcetato 3 M a pH 5,2 e 2 volumi di Etanolo assoluto freddo.

Il campione è stato tenuto 20 min. in ghiaccio e poi centrifugato in una minicentrifuga a 14.000 rpm per 12 min. Il pellet è stato lavato tre volte con 1 ml di Etanolo freddo al 70% e quindi è stato essiccato sotto vuoto per 5 min. Il pellet è stato poi risospeso in 84 μ l di H₂O e sottoposto a digestione enzimatica con l'enzima di restrizione XbaI.

Digestione di restrizione con l'enzima XbaI:

DNA risospeso in H ₂ O (10 μ g)	84 μ l
tampone di restrizione 10X (NEB2)	10 μ l
BSA 100X (100mg/ml)	1 μ l
XbaI (10U/ml)	<u>5 μl</u>
	100 μ l

La miscela è stata incubata a 37°C per 4 ore e il prodotto di digestione è stato precipitato ed essiccato come è stato descritto precedentemente. Il DNA è stato risospeso in 30 μ l di H₂O.

I due frammenti di DNA corrispondenti allo scheletro plasmidico (pCMV di 4400bp) ed all'inserto (ECD-TM di 2100bp) sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1%.

La banda corrispondente all'inserto è stata tagliata ed il DNA è stato eluito dal gel utilizzando il Qiaquick gel extraction kit della Qiagen Italia.

Parallelamente il nuovo scheletro plasmidico (pCMV3.1H/N-4CpG) in cui inserire il frammento di DNA corrispondente all'ECD-TM della p185 di

ratto, è stato digerito con gli stessi enzimi di restrizione ed è stato eluito dal gel di agarosio.

I frammenti di DNA corrispondenti all'ECD-TM di ratto ed al plasmide linearizzato pCMV3.1H/N-4CpG sono stati usati per ottenere il pCMV3.1H/N-rECD-TM-4CpG mediante reazione di ligazione.

Reazione di ligazione:

DNA inserto (rECD-TM) (50 ng/ μ l)	2 μ l
DNA plasmidico linearizzato (pCMV3.1H/N4CpG) (50 ng/ μ l)	1 μ l
Tampone di reazione 10X per la T4 DNA ligasi	1 μ l
T4 DNA ligasi (2U/ μ l)	1 μ l
H ₂ O	<u>5 μl</u>
	10 μ l

La reazione di ligazione è stata incubata a 16°C per 4 ore.

Il prodotto di ligazione è stato poi utilizzato per trasformare il ceppo batterico di *E. coli* DH5 α . Le cellule batteriche sono state rese competenti con la tecnica del CaCl₂.

Trasformazione del ceppo batterico DH5 α :

Cellule batteriche competenti	100 μ l
Prodotto di ligazione	5 μ l

Affinché il DNA plasmidico penetri nelle cellule competenti, queste ultime sono state tenute in ghiaccio per 40 min. e sottoposte a shock termico ponendole a 42°C per 1 min. e mezzo e quindi in ghiaccio per altri 2 min.

Dopo aver aggiunto 1 ml di terreno di crescita LB, le cellule batteriche trasformate sono state incubate a 37°C per 1 ora per ripristinare le loro condizioni fisiologiche.



La sospensione cellulare è stata quindi centrifugata a 6000 rpm per 1 min. ed il pellet è stato risospeso in 100 μ l di LB.

Le cellule sono state seminate in piastre Petri contenenti terreno selettivo solido (LB con agar + ampicillina 100 μ g/ml) e lasciate crescere a 37°C per 1 notte. La presenza di ampicillina permette la crescita solamente delle cellule che contengono il plasmide pCMV3.1H/N-rECD-TM-4CpG in cui è presente il gene per la resistenza all'ampicillina.

I cloni ottenuti sono stati analizzati mediante lisi alcalina per individuare quello/i contenenti il plasmide ricombinante pCMV3.1H/N-rECD-TM-4CpG.

Per ottenere il plasmide chimera pCMV3.1H/N-r1°cys-h2°cysTM-8CpG, il plasmide pCMV3.1H/N-rECD-TM-4CpG è stato digerito con gli enzimi di restrizione BstEII e XbaI per eliminare il 2° subdominio cisteinico insieme al dominio transmembrana della p185^{neu} di ratto. Contemporaneamente è stato digerito con gli stessi enzimi il plasmide pCMV3.1hECD-TM-4CpG per isolare il frammento di DNA che corrisponde al 2° subdominio cisteinico ed al dominio transmembrana del gene umano.

Digestione con BstEII:

DNA plasmidico (1 μ g/ μ l) 10 μ l

Tampone di restrizione 10X (NEB3) 10 μ l

BstEII (10U/ μ l) 5 μ l

H_2O 75 μ l

100 μ l volume finale

La miscela è stata incubata a 60°C per 4 ore.

La digestione di restrizione con XbaI, il recupero dei frammenti da

utilizzare per il clonaggio, la reazione di ligazione e la trasformazione delle cellule competenti sono stati descritti precedentemente.

Ottenuto il plasmide chimera pCMV3.1H/N-r1[°]cys-h2[°]cysTM-8CpG è stato analizzato mediante il sequenziamento di Sanger utilizzando il sequenziatore automatico della Applied Biosystem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, per verificare la corretta inserzione del frammento di DNA corrispondente al 2[°] subdominio cisteinico ed al dominio transmembrana del gene umano.

Esempio 2 – test in vivo

Animali

Per tutti gli esperimenti sono stati utilizzati topi femmina del ceppo Balb/cAnCr (H-2d) di circa sette settimane.

Gli animali provengono dai Laboratori Charles River (Calco, MI, Italia), dove sono allevati in condizioni asettiche ed in conformità a quanto stabilito dalla Comunità Europea.

Somministrazione intramuscolo seguita da elettroporazione in vivo

Per evitare contrazioni indesiderate del muscolo tibiale, prima della vaccinazione ogni topo è stato anestetizzato mediante l'inoculo i.p. di 300 µl di avertina, composta con 0.58 g di tribromoetanolo (Sigma-Aldrich) e 310 µl di Tert-Amyl alcohol (Aldrich) sciolti in 39.5 ml di H₂O deionizzata. Tutti i topi sono quindi stati rasati a livello del muscolo tibiale, in modo da rendere più facile la vaccinazione.

Gli animali sono stati immunizzati mediante l'inoculo, a livello di entrambi i muscoli antero-tibiali, di 40 µl di soluzione contenente 50µg di DNA.

La miscela contenente il DNA è stata preparata poco prima dell'uso, in

accordo con le indicazioni della Dott.ssa F. Pericle (Valentis, Inc., The Woodlands, Texas, USA). Tale soluzione contiene rispettivamente: DNA plasmidico alla concentrazione di 1.25 mg/ml, sale sodico poli-L-glutammato alla concentrazione di 6 mg/ml (Sigma-Aldrich, S.r.l., Milano, Italia), cloruro di sodio (150 mM) (Fluka, BioChemika, Buchs, Switzerland) ed acqua distillata priva di endotossine (Nucleare Free Water, Promega Corporation) per raggiungere il volume finale di 1 ml.

Dopo circa 5 minuti dall'inoculo, l'area trattata è stata sottoposta ad elettroporazione, mediante due impulsi elettrici dell'intensità di 375 V/cm² e della durata di 25 ms l'uno, usando l'elettroporatore Electro Square Porator (T820; BTX, San Diego, CA, USA). Gli impulsi elettrici transcutanei sono stati applicati mediante l'uso di due elettrodi quadrangolari d'acciaio posti a 3 mm l'uno dall'altro, ai lati di ogni zampa. L'immunizzazione genica mediante elettroporazione è stata eseguita due volte per ogni animale 21 e 7 gg prima di inoculare le cellule tumorali.

Inoculo delle cellule tumorali

I topi sono stati inoculati nel fianco sinistro con 0.2 ml di una sospensione contenente 2×10^5 cellule D2F2/E2. Tali cellule derivano da un tumore mammario insorto spontaneamente in un nodulo alveolare iperplastico di topo BALB/c e sono trasfettate con la p185 di uomo in modo da esprimerla in membrana ad alti livelli.

Valutazione della crescita tumorale in vivo

La crescita tumorale è stata valutata ogni settimana mediante palpazione, e la dimensione dei tumori è stata misurata lungo due diametri perpendicolari attraverso un calibro. Masse neoplastiche di dimensione

maggiori di 3 millimetri sono considerate tumori.

La crescita tumorale è stata seguita per 100 giorni dall'inoculo del tumore o fino alla crescita del tumore oltre i 10 millimetri di diametro, momento in cui gli animali sono stati sacrificati.

Tabella

Topi: BALB/c femmine

Tumore: D2F2-E2 esprimente la p185^{neu} umana

plasmidi	n° topi	protezione	anticorpi
pCMV3.1H/N-8CpG	5	0%	-
pCMV3.1H/N-hECD-TM-8CpG	5	100%	+++
pCMV3.1H/N-hECD1-TM-8CpG	5	100%	-
pCMV3.1H/N- hECD2-TM-8CpG	5	100%	-
pCMV3.1H/N- hECD3-TM-8CpG	5	100%	+
pCMV3.1H/N- hECD4-TM-8CpG	5	100%	++
pCMV3.1H/N- hECD5-TM-8CpG	5	60%	-
pCMV3.1H/N- hECD6-TM-8CpG	5	0%	-
pCMV3.1H/N- hECD7-TM-8CpG	5	0%	-
pCMV3.1H/N-r1°cys-h2°cys.-TM-8CpG	5	100%	+++

Elenco oligonucleotidi sintetizzati ed usati per la costruzione dei plasmidi

#1. AccIII-TAA-4CpG-erbB2 senso 71 nt

5'CCGGAAGTAAATAATCGACGTTCAAATAATCGACGTTCAAA

TAATCGACGTTCAAATAATCGACGTTCAAT 3'

#2. XbaI-TAA-4CpG-erbB2 antisenso 71 nt

5'CTAGATTGAACGTCGATTATTGAACGTCGATTATTGAACG
TCGATTATTGAACGTCGATTATTACTT 3'

#3. AccIII-TAA-4noCpG-erbB2 senso 71 nt

5'CCGGAAGTAAATAATAGAGCTTCAAATAATAGAGCTTCAA
TAATAGAGCTTCAAATAATAGAGCTTCAAT 3'

#4. XbaI-TAA-4noCpG-erbB2 antisenso 71 nt

5'CTAGATTGAAGCTCTATTATTGAAGCTCTATTATTGAAGC
TCTATTATTGAAGCTCTATTATTACTT 3'

#5. HindIII-NheI senso 27nt

5' CTAGGAAGCTTGTAACTTGCTAGCT 3'

#6. HindIII-NheI antisenso 27 nt

5'AGCTAGCTAGCAAGTTAAACACAAGCTTC 3'

#7. XbaI-4CpG-neu senso 68 nt

5'CTAGATAATCGACGTTCAAATAATCGACGTTCAAATAATCG
ACGTTCAAATAATCGACGTTCAAGTTT 3'

#8. PmeI-CpG-neu antisenso 64 nt

5'AAACTTGAACGTCGATTATTGAACGTCGATTATTGAACGT
CGATTATTGAACGTCGATTAT 3'

#9. XbaI-4noCpG-neu senso 68 nt

5'CTAGATAATAGAGCTTCAAATAATAGAGCTTCAAATAATAG
AGCTTCAAATAATAGAGCTTCAAGTTT 3'

#10. PmeI-4noCpG-neu antisenso 64 nt

5'AAACTTGAAGCTCTATTATTGAAGCTCTATTATTGAAGCT

CTATTATTTGAAGCTCTATTAT 3'

#11. T7 primer

5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

#12. BstEII-neuleader antisenso 32 nt

5' GGCGGGTTACCCGCGATTCCGGGGGGCAGGAG 3'

#13. hECD1-TM-senso-NheI 35 nt

5' CCGGCTAGCTAGCCTGTCCTGCAGGATATCC 3'

#14. hECD2-TM-senso-NheI 35 nt

5' CCGGCTAGCTAGCGGAGGGTCTGATCCAGCGGA 3'

#15. hECD3-TM-senso-NheI 35 nt

5' CCGGCTAGCTAGCCTGCCACTGACTGCTGCCATG 3'

#16. hECD4-TM-senso-NheI 35 nt

5' CCGGCTAGCTAGCTGCACCCTCGTCTGCCCTGC 3'

#17. hECD5-TM-senso-NheI 35 nt

5' CCGGCTAGCTAGCCGCTCCAGCCAGAGCAGCTCC 3'

#18. hECD6-TM-senso-NheI 35 nt

5' CCGGCTAGCTAGCAACACCCACCTCTGCTCGTGC 3'

#19. hECD7-TM-senso-NheI 35 nt

CCGGCTAGCTAGCCCCAGGGAGTATGTGAATGCCA 3'

#20. pcDNA3.1/BGH Reverse primer 20 nt

5' TAGAAGGCACAGTCGAGGCT 3'

#21. NheI-neuleader-antisenso 43 nt

5' CCGGCTAGCTAGCCGCGATTCCGGGGGGCAGGAGGGCGAGG

AG 3'

#22. His-myc-senso-noNheI 69 nt

5'CTAGGCATCATCATCATCATCATAATGGTCATAACCGGTGAAC
AAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGG 3'

#23. His-myc-antisenso-NheI 69 nt

5'CTAGCCAGATCCTCTTGAGATGAGTTTGTTCAACCGGTAA
TGACCATTATGATGATGATGATGC 3'

#24. NheI-73neu antisenso 35 nt

5'CCGGCTAGCTAGCGCTGGCATTGGCAGGCACGTAG 3'

#25. NheI-153neu antisenso 35 nt

5'CCGGCTAGCTAGCCAGGATCTCTGTGAGA~~CTTCGA~~ 3'

#26. NheI-233neu antisenso 35 nt

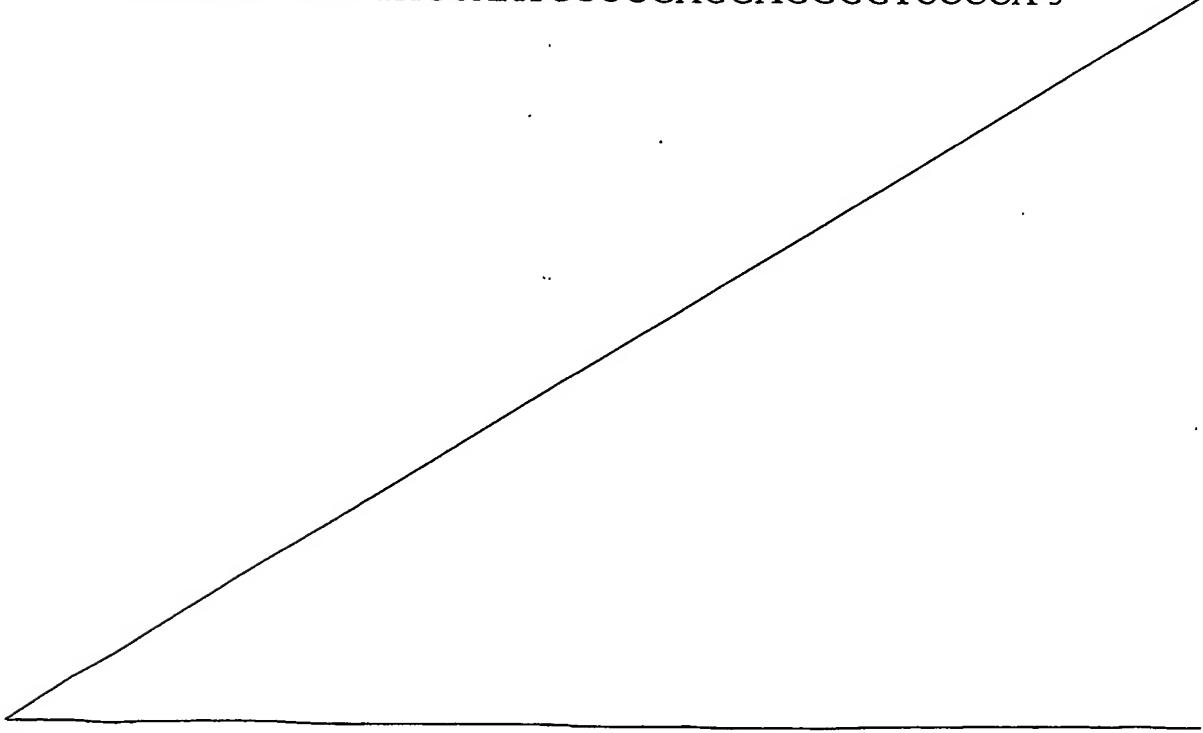
5'CCGGCTAGCTAGGCCCTTGCACCGGGCACACCA 3'

#27. NheI-313neu antisenso 35 nt

5'CCGGCTAGCTAGCTCCACTTCCGTAGACAGGTAG 3'

#28. NheI-393neu antisenso 35 nt

5'CCGGCTAGCTAGCAATGCCGGAGGAGGGGTCCCCA 3'



LISTA DI SEQUENZE

<110> INDENA S.p.A.

<120> DNA CODIFICANTE p185 ^{neu} E SUOI USI TERAPEUTICI

<130> 7118M

<160> 42

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 922

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 1
ccggggccgga gcccgaatga tcatacatgga gctggcgccgct tggtgccgct gggggttcct 60
cctcggccctc ctgccccccg gaatcgcggg ttacacctatac atctcagcat gcccggacag 120
cctgcctgac ctcagcgtct tccagaacct gcaagtaatc cggggacgaa ttctgcacaa 180
tggcgcttac tcgctgaccc tgcaagggtct gggcatcago tggctggggc tgcgctcact 240
gagggaaactg ggcagtggac tggccctcat ccaccataac acccacctct gttcgtgca 300
cacggtgccc tgggaccagc tctttcgaa cccgcaccaa gctctgctcc acactgccaa 360
ccggccagag gacgagtgtg tggcgaggg cctggcctgc caccagctgt ggcggcagg 420
gcactgctgg ggtccagggc ccacccagtg tgtcaactgc agccagttcc ttcggggcca 480
ggagtgcgtg gaggaatgcc gagtactgca ggggtcccc agggagttatg tgaatgccag 540
gcactgtttg ccgtgccacc ctgagtgta gccccagaat ggctcagtga cctgtttgg 600
accggaggct gaccagtgtg tggcctgtgc ccactataag gaccctccct tctgcgtggc 660
ccgctgcccc agcgggtgtga aacctgaccc ctccatcatg cccatctgga agtttccaga 720
tgaggaggc gcatgccagc cttgccccat caactgcacc cactcctgtg tggacctgga 780
tgacaagggc tgccccgccc agcagagagc cagccctctg acgtccatcg tctctgcgggt 840



ggttggcatt ctgctggtcg tggtcttggg ggtggtcttt gggatcctca tcaagcgacg 900
gcagcagaag atccggaagt aa 922

<210> 2

<211> 2083

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 2
ccggggccgga gccgcaatga tcatacatgga gctggcggcc tggtggcgct ggggggttct 60
cctcgccctc ctgccccccg gaatcgccgg cacccaagtg tgtaccggca cagacatgaa 120
gttgcggctc cctgccagtc ctgagaccca cctggacatg ctccgccacc tgtaccaggg 180
ctgtcaggta gtgcagggca acttggagct tacctacgtg cctgccaatg ccagcctctc 240
attcctgcag gacatccagg aagttcaggg ttacatgctc atcgctcaca accaggtgaa 300
gcgcgtccca ctgcaaaggc tgcgcacatcgat gagagggacc cagctcttg aggacaagta 360
tgccctggct gtgctagaca accgagatcc tcaggacaat gtcgcgcct ccacccagg 420
cagaacccca gaggggctgc gggagctgca gcttcgaagt ctcacagaga tcctgaaggg 480
aggagttttg atccgtggga accctcagct ctgctaccag gacatggttt tgtggaaagga 540
cgtcttccgc aagaataacc aactggctcc tgtcgatata gacaccaatc gttccgggc 600
ctgtccaccc tggcccccgg cctgcaaaaga caatcactgt tggggtgaga gtccggaaaga 660
ctgtcagatc ttgactggca ccatctgtac cagtggttgc gcccggtgca agggccggct 720
gcccactgac tgctgccatg agcagtgtgc cgaggctgc acggggccca agcattctga 780
ctgcctggcc tgcctccact tcaatcatag tggtatctgt gagctgcact gcccagccct 840
cgtcacctac aacacagaca cctttgagtc catgcacaac cctgagggtc gctacacctt 900
tggtgccagc tgcgtgacca cctgccccta caactacctg tctacggaag tgggatcctg 960
cactctggtg tgtccccca ataaccaaga ggtcacagct gaggacggaa cacagcgttg 1020
tgagaaatgc agcaagccct gtgctcgagt gtgctatggt ctgggcatgg agcaccttcg 1080
aggggcgagg gccatcacca gtgacaatgt ccaggagttt gatggctgca agaagatctt 1140
tgggagcctg gcattttgc cggagagctt tggatgggac ccctcctccg gcattgctcc 1200
gctgaggcct gaggcagctcc aagtgttcga aaccctggag gagatcacag gttacctata 1260
catctcagca tggccggaca gcctgcctga cctcagcgtc ttccagaacc tgcaagtaat 1320
ccggggacga attctgcaca atggcgccata ctcgctgacc ctgcaagggc tgggcatcag 1380

ctggctgggg ctgcgctcac tgagggact gggcagtgg a ctggccctca tccaccataa 1440
caccacaccc tcgttcgtgc acacggtgcc ctgggaccag ctcttcgg a acccgacca 1500
agctctgctc cacactgcca accggccaga ggacgagtgt gtggcgagg gcctggcctg 1560
ccaccagctg tgcccccgg ggcactgctg gggccaggccc acccactgt gtgtcaactg 1620
cagccagttc cttccccccagg aggtgcgt ggaggaatgc cgactgtc aggggctccc 1680
cagggagttat gtgaatgcca ggcactgttt gccgtgccac cctgagtgtc agccccagaa 1740
tggctcagt acctgtttt gaccggaggc tgaccagtgt gtggctgtc cccactataa 1800
ggaccctccc ttctgcgtgg cccgctgccc cagcgggtgtaa acctgacc tctcctacat 1860
gccccatctgg aagtttccag atgaggaggc cgcatgccag cttgccccca tcaactgcac 1920
ccactcctgt gtggacctgg atgacaaggc ctgccccggc gagcagagag ccagccctct 1980
gacgtccatc gtctctgcgg tggttggcat tctgctggtc gtggctttgg ggggtggtott 2040
tgggatcctc atcaagcgac ggcagcagaa gatccggaag taa 2083

<210> 3

<211> 1939

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 3
ccggggccgga gcccgaatga tcatcatgg a gctggcggcc tgggtggcgt gggggttcct 60
cctcgccctc ctgccccccg gaatcgccgc tagcctgtcc ttccctgcagg atatccagga 120
ggtgcagggc tacgtgctca tcgctcacaa ccaagtggcagg cagggtccac tgcagaggct 180
gcggatttg cggggcaccc agctcttga ggacaactat gcccggccg tgctagacaa 240
tggagacccg ctgaacaata ccacccctgt cacaggggccc tccccaggag gcctgcggga 300
gctgcagctt cgaaggctca cagagatctt gaaaggagggt gtcttgatcc agcggaaaccc 360
ccagctctgc taccaggaca cgattttgtg gaaggacatc ttccacaaga acaaccagct 420
ggctctcaca ctgatagaca ccaaccgctc tcgggcctgc caccctgtt ctccgatgtg 480
taagggctcc cgctgctggg gagagagttc tgaggattgt cagacccgtga cgccgactgt 540
ctgtgccgggt ggctgtgccc gctgcaaggc gcccactgccc actgactgt gcccgtgca 600
gtgtgctgcc ggctgcacgg gccccaaagca ctctgactgc ctggcctgcc tccacttcaa 660
ccacagtggc atctgtgagc tgcactgccc agccctggtc acctacaaca cagacacgtt 720
tgagtccatg cccaaatcccg agggccggta tacattcgcc gccagctgtg tgactgcctg 780

tccctacaac tactttcta cggacgtggg atcctgcacc ctcgtctgcc ccctgcacaa	840
ccaagaggtg acagcagagg atggaacaca gcggtgtgag aagtgcagca agccctgtgc	900
ccgagtgtgc tatggtctgg gcatggagca cttgcgagag gtgagggcag ttaccagtgc	960
caatatccag gagtttgctg gctgcaagaa gatcttggg agcctggcat ttctgccgga	020
gagctttgat ggggaccag cctccaacac tgccccgctc cagccagagc agctccaagt	080
gtttgagact ctggaagaga tcacaggta cctatacatc tcagcatggc cggacagcct	140
gcctgaccc agcgtctcc agaacctgca agtaatccgg ggacgaattc tgcacaatgg	1200
cgcctactcg ctgaccctgc aagggtggg catcagctgg ctggggctgc gctcactgag	1260
ggaactgggc agtggactgg ccctcatcca ccataacacc cacctctgct tcgtgcacac	1320
ggtgccctgg gaccagctct ttcggaaccc gcaccaagct ctgctccaca ctgccaaccg	1380
gccagaggac gagtgtgtgg gcgagggcct ggcctgccac cagctgtgeg cccgagggca	1440
ctgctggggt ccagggccca cccagtgtgt caactgcagc cagttccttc ggggccagga	1500
gtgcgtggag gaatgccgag tactgcaggg gctccccagg .gagtatgtga atgccagggca	1560
ctgtttgcgg tgccaccctg agtgtcagcc ccagaatggc tcagtgaccc ttttggacc	1620
ggaggctgac cagtgtgtgg cctgtgccca ctataaggac cctcccttct gcgtggcccg	1680
ctgccccagc ggtgtgaaac ctgacctctc ctacatgccc atctgaaatgt ttccagatga	1740
ggagggcgca tgccagcctt gccccatcaa ctgcacccac tcctgtgtgg acctggatga	1800
caagggctgc cccgcccagc agagagccag ccctctgacg tccatctgtct ctgcgggttgt	1860
tggcattctg ctggcgtgg tcttgggggt ggtcttggg atcctcatca agcgacggca	1920
gcagaagatc cggaagtaa	1939

<210> 4

<211> 1699

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 4	
ccggggccgga gcccgaatga tcatacatgga gctggcggcc tgggtggccctt gggggttcct	60
cctcgccctc ctgccccccg gaatcgccgc tagcggaggg gtcttgcattcc agcgaaaccc	120
ccagctctgc taccaggaca cgatTTTGTG gaaggacatc ttccacaaga acaaccagct	180
ggctctcaca ctgatagaca ccaaccgctc tcggggctgc caccctgtt ctccgatgtg	240
taagggtcc cgctgctggg gagagagttc tgaggattgt cagagcctga cgcgactgt	300

ctgtgccggt ggctgtgcc	gctgcaaggg gccactgccc	actgactgct gccatgagca	360				
gtgtgctgcc	ggctgcacgg	gccccaaagca ctctgactgc	ctggcctgcc	tccacttcaa	420		
ccacagtggc	atctgtgagc	tgcactgccc	agccctggtc	acctacaaca	cagacacgtt	480	
tgagtccatg	cccaatcccc	agggccggt	ta	cattcggc	gccagctgtg	tgactgcctg	540
tccctacaac	tacctttcta	cggacgtggg	atcctgcacc	ctcg	tctgcc	ccctgcacaa	600
ccaagaggtg	acagcagagg	atggaacaca	gcgggtgtgag	aagtgcagca	agccctgtgc	660	
ccgagtgtgc	tatggtctgg	gcatggagca	cttgcgagag	gtgagggcag	ttaccagtgc	720	
caatatccag	gagtttgctg	gctgcaagaa	gatcttggg	agcctggcat	ttctgccgga	780	
gagctttgat	ggggacccag	cctccaacac	tgccccgctc	cagccagagc	agctccaagt	840	
gtttgagact	ctggaagaga	tcacaggta	cctatacatac	tcagcatggc	cgacagcct	900	
gcctgacctc	agcgtcttcc	agaacctgca	agtaatccgg	ggacgaattc	tgcacaatgg	960	
cgcctactcg	ctgaccctgc	aagggctggg	catcagctgg	ctgggctgc	gctcactgag	1020	
ggaactgggc	agtggactgg	ccctcatcca	ccataacacc	cacctctgt	tcgtgcacac	1080	
ggtgccctgg	gaccagctct	ttcggAACCC	gcaccaagct	ctgctccaca	ctgccaaccg	1140	
gccagaggac	gagtggtgtgg	gcgagggcct	ggcctgccac	cagctgtgcg	cccgagggca	1200	
ctgctggggt	ccagggccca	cccagtgtgt	caactgcagc	cagttccttc	ggggccagga	1260	
gtgcgtggag	aatgcccag	tactgcaggg	gctccccagg	gagtatgtga	atgccagga	1320	
ctgtttgccg	tgccaccctg	agtgtcagcc	ccagaatggc	tcagtgacct	gttttggacc	1380	
ggaggctgac	cagtggtgtgg	cctgtgccca	ctataaggac	cctcccttct	gcgtggcccg	1440	
ctgccccagc	ggtgtgaaac	ctgacctctc	ctacatgccc	atctggaagt	ttccagatga	1500	
ggagggcgca	tgccagcctt	gccccatcaa	ctgcacccac	tcctgtgtgg	acctggatga	1560	
caagggctgc	cccgccgagc	agagagccag	ccctctgacg	tccatcgtct	ctgcgggtgt	1620	
tggcattctg	ctggtcgtgg	tcttgggggt	ggtctttggg	atcctcatca	agcgacggca	1680	
gcagaagatc	cggaagtaa					1699	

<210> 5

<211> 1459

<212> DNA

<213> human/rat



<400> 5

ccggggccgga

gccgcaatga

tcatcatgga

gctggcggcc

tggtggcgct

gggggttcct

60

cctcgccctc	ctgccccccg	gaatcgccggc	tagcctgccc	actgactgct	gccatgagca	120
gtgtgctgcc	ggctgcacgg	gccccaaagca	ctctgactgc	ctggcctgcc	tccacttcaa	180
ccacagtggc	atctgtgagc	tgcactgccc	agccctggtc	acctacaaca	cagacacgtt	240
tgagtccatg	cccaatcccg	agggccggta	tacattcggc	gccagctgtg	tgactgcctg	300
tccctacaac	tacctttcta	cggacgtggg	atcctgcacc	ctcgctgcc	ccctgcacaa	360
ccaagaggtg	acagcagagg	atggaacaca	gccccgtgtgag	aagtgcagca	agccctgtgc	420
ccgagtgtgc	tatggtctgg	gcatggagca	cttgcgagag	gtgagggcag	ttaccagtgc	480
caatatccag	gagtttgctg	gctgcaagaa	gatctttggg	agcctggcat	ttctgcccgg	540
gagctttgat	ggggacccag	cctccaacac	tgccccgctc	cagccagagc	agctccaagt	600
gtttgagact	ctggaagaga	tcacaggtt	cctatacatc	tcagcatggc	cgacacgcct	660
gcctgacctc	agcgtcttcc	agaacctgca	agtaatccgg	ggacgaaattc	tgcacaatgg	720
cgcctactcg	ctgaccctgc	aagggctggg	catcagctgg	ctggggctgc	gctcaactgag	780
ggaactgggc	agtggactgg	ccctcatcca	ccataacacc	cacctctgct	tcgtgcacac	840
ggtgccctgg	gaccagctct	ttcggAACCC	gcaccaagct	ctgctccaca	ctgccaacccg	900
gccagaggac	gagtgtgtgg	gcgagggcct	ggcctgcccac	cagctgtgcg	cccgagggca	960
ctgctggggt	ccagggccca	cccagtgtgt	caactgcagc	cagttccctc	ggggccagga	1020
gtgcgtggag	gaatgccgag	tactgcaggg	gctccccagg	gagtagtga	atgccaggca	1080
ctgtttgccg	tgccaccctg	agtgtcagcc	ccagaatggc	tcagtgacct	gttttggacc	1140
ggaggctgac	cagtgtgtgg	cctgtccccca	ctataaggac	cctcccttct	gcgtggcccg	1200
ctgccccagc	ggtgtgaaac	ctgacccttc	ctacatgccc	atctggaagt	ttccagatga	1260
ggagggcgc	tgccagcctt	gccccatcaa	ctgcacccac	tcctgtgtgg	acctggatga	1320
caagggctgc	cccgccgagc	agagagccag	ccctctgacg	tccatctgtct	ctgcgggtgt	1380
tggcattctg	ctggtcgtgg	tcttgggggt	ggtctttggg	atcctcatca	agcgacggca	1440
gcagaagatc	cggaagtaa					1459

<210> 6

<211> 1219

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 6

ccggggccgga gcccgaatga tcatcatgga gctggcggcc tggtgccgct gggggttcct 60

cctcgccctc	ctgccccccg	gaatcgccgc	tagctgcacc	ctcgctgccc	ccctgcacaa	120
ccaagagggt	acagcagagg	atggaacaca	gcggtgtgag	aagtgcagca	agccctgtgc	180
ccgagtgtgc	tatggtctgg	gcatggagca	cttgcgagag	gtgagggcag	ttaccagtgc	240
caatatccag	gagtttgctg	gctgcaagaa	gatctttggg	agcctggcat	ttctgccgga	300
gagctttgat	ggggacccag	cctccaacac	tgccccgctc	cagccagagc	agctccaagt	360
gtttgagact	ctggaagaga	tcacaggta	cctatacatc	tcagcatggc	cggacagcct	420
gcctgacctc	agcgtcttcc	agaacctgca	agtaatccgg	ggacgaattc	tgcacaatgg	480
cgcctactcg	ctgaccctgc	aagggctggg	catcagctgg	ctggggctgc	gctcactgag	540
ggaactgggc	agtggactgg	ccctcatcca	ccataacacc	cacctctgt	tcgtgcacac	600
ggtgccctgg	gaccagctct	ttcggAACCC	gcaccaagct	ctgctccaca	ctgccaaccg	660
gccagaggac	gagtgtgtgg	gceggggcct	ggcctgccac	cagctgtgeg	cccggggca	720
ctgctggggt	ccagggccca	cccagtgtgt	caactgcagc	cagttcccttc	ggggccagga	780
gtgcgtggag	aatgcccag	tactgcaggg	gctccccagg	gagtatgtga	atgccaggca	840
ctgtttgccg	tgccaccctg	agtgtcagcc	ccagaatggc	tcagtgacct	gttttggacc	900
ggaggctgac	cagtgtgtgg	cctgtgcccc	ctataaggac	cctcccttct	gcgtggcccg	960
ctgccccagc	ggtgtgaaac	ctgacctctc	ctacatgccc	atctggaagt	ttccagatga	1020
ggagggcgca	tgccagcctt	gccccatcaa	ctgcacccac	tcctgtgtgg	acctggatga	1080
caagggctgc	cccgccgagc	agagagccag	ccctctgacg	tccatgtct	ctgcgggtgt	1140
tggcattctg	ctggctgtgg	tcttgggggt	ggtctttggg	atcctcatca	agcgacggca	1200
gcagaagatc	cggaagtaa					1219

<210> 7

<211> 979

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 7

ccggggccgga	gccgcaatga	tcatcatgga	gctggccggc	tggtggcgct	gggggttcct	60
cctcgccctc	ctgccccccg	gaatcgccgc	tagcccgctc	cagccagagc	agctccaagt	120
gtttgagact	ctggaagaga	tcacaggta	cctatacatc	tcagcatggc	cggacagcct	180
gcctgacctc	agcgtcttcc	agaacctgca	agtaatccgg	ggacgaattc	tgcacaatgg	240
cgcctactcg	ctgaccctgc	aagggctggg	catcagctgg	ctggggctgc	gctcactgag	300

ggaactgggc agtggactgg ccctcatcca ccataaacacc cacctctgct tcgtgcacac	360
ggtgccctgg gaccagctct ttccggAACCC gcaccaagct ctgctccaca ctgccaaccg	420
gccagaggac gagtgtgtgg gcgagggcct ggccctgccac cagctgtgcg cccgagggca	480
ctgctgggtt ccagggccca cccagtgtgt caactgcagc cagttcccttc ggggccagga	540
gtgcgtggag gaatgccgag tactgcaggg gctcccccagg gagtatgtga atgccaggca	600
ctgtttgccg tgccaccctg agtgtcagcc ccagaatggc tcagtgaccc ttttggacc	660
ggaggctgac cagtgtgtgg cctgtgcccataaggac cctcccttct gcgtggcccg	720
ctgccccagc ggtgtgaaac ctgacccctc ctacatgccc atctggaagt ttccagatga	780
ggagggcgca tgccagcctt gccccatcaa ctgcacccac tcctgtgtgg acctggatga	840
caagggctgc cccgcccagc agagagccag ccctctgacg tccatcg <u>t</u> ct ctgcggtggt	900
tggcattctg ctggcgtgtgg tcttgggggt ggtctttggg atccctcatca agcgacggca	960
gcagaagatc cgaaagtaa	979

<210> 8

<211> 739

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 8	
ccggggccgga gcccgaatga tcatcatggaa gctggcggcc tgggtggccctt gggggttccct	60
cctcgccctc ctgcccccccg gaatcgccgc tagcaacacc cacctctgct tcgtgcacac	120
ggtgccctgg gaccagctct ttccggAACCC gcaccaagct ctgctccaca ctgccaaccg	180
gccagaggac gagtgtgtgg gcgagggcct ggccctgccac cagctgtgcg cccgagggca	240
ctgctgggtt ccagggccca cccagtgtgt caactgcagc cagttcccttc ggggccagga	300
gtgcgtggag gaatgccgag tactgcaggg gctcccccagg gagtatgtga atgccaggca	360
ctgtttgccg tgccaccctg agtgtcagcc ccagaatggc tcagtgaccc ttttggacc	420
ggaggctgac cagtgtgtgg cctgtgcccataaggac cctcccttct gcgtggcccg	480
ctgccccagc ggtgtgaaac ctgacccctc ctacatgccc atctggaagt ttccagatga	540
ggagggcgca tgccagcctt gccccatcaa ctgcacccac tcctgtgtgg acctggatga	600
caagggctgc cccgcccagc agagagccag ccctctgacg tccatcg <u>t</u> ct ctgcggtggt	660
tggcattctg ctggcgtgtgg tcttgggggt ggtctttggg atccctcatca agcgacggca	720
gcagaagatc cgaaagtaa	739

<210> 9

<211> 499

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 9

ccggggccgga	gccgcaatga	tcatcatgga	gctggcggcc	tggtgccgct	gggggttcct	60
cctcgccctc	ctgccccccg	gaatcgcggc	tagccccagg	gagttatgtga	atgccaggca	120
ctgtttgccg	tgccaccctg	agtgtcagcc	ccagaatggc	tcaagtgaccc	gttttggacc	180
ggaggctgac	cagtgtgtgg	cctgtgccc	ctataaggac	cctcccttct	gcgtggcccg	240
ctgccccagc	ggtgtgaaac	ctgacctctc	ctacatgccc	atctggaa	gttccagatga	300
ggagggcgca	tgccagcctt	gccccatcaa	ctgcacccac	tcctgtgtgg	acctggatga	360
caagggctgc	cccgccgagc	agagagccag	ccctctgacg	tccatcgct	ctgcgggtgg	420
tggcattctg	ctggtcgtgg	tcttgggggt	ggtctttggg	atcctcatca	agcgacggca	480
gcagaagatc	cggaagtaa					

<210> 10

<211> 2086

<212> DNA

<213> human/rat



16,33 Euro

<400> 10

ccggggccgga	gccgcaatga	tcatcatgga	gctggcggcc	tggtgccgct	gggggttcct	60
cctcgccctc	ctgccccccg	gaatcgcggc	cacccaagtg	tgtaccggca	cagacatgaa	120
gttgcggctc	cctgccagtc	ctgagaccca	cctggacatg	ctccgccacc	tgtaccagg	180
ctgtcaggtt	gtgcagggca	acttggagct	tacctacgtg	cctgc当地atg	ccagcgctag	240
cctgtccttc	ctgcaggata	tccaggaggt	gcagggctac	gtgctcatcg	ctcacaacca	300
agtgaggcag	gtcccactgc	agaggctgag	gattgtgcga	ggcacccagc	tcttgagga	360
caactatgcc	ctggccgtgc	tagacaatgg	agacccgctg	aacaatacca	cccctgtcac	420
aggggcctcc	ccaggaggcc	tgcgaggagct	gcagcttcga	agcctcacag	agatcttggaa	480
aggaggggtc	ttgatccagc	ggaaccccca	gctctgctac	caggacacga	ttttgtggaa	540
ggacatcttc	cacaagaaca	accagctggc	tctcacactg	atagacacca	accgctctcg	600
ggcctgcca	ccctgttctc	cgatgtgtaa	gggctcccgc	tgctggggag	agagttctga	660

ggattgtcag agcctgacgc gcactgtctg tgccgggtggc tgtgcccgt gcaaggggcc 720
actgcccact gactgctgcc atgagcagtg tgctgccggc tgcacgggcc ccaagcactc 780
tgactgcctg gcctgcctcc acttcaacca cagtggcatac tgtgagctgc actgcccagc 840
cctggtcacc tacaacacag acacgttga gtccatgccc aatcccgagg gccggtatac 900
attcggcgcc agctgtgtga ctgcctgtcc ctacaactac ctttctacgg acgtgggatc 960
ctgcaccctc gtctgcccccc tgcacaacca agaggtgaca gcagaggatg gaacacagcg 1020
gtgtgagaag tgcagcaagc cctgtgccc agtgtgctat ggtctggca tggaggactt 1080
gcgagaggtg agggcagttt ccagtgc当地 tatccaggag tttgctggct gcaagaagat 1140
ctttgggagc ctggcatttc tgccggagag ctttgc当地 gaccgc当地 ccaacactgc 1200
cccgctccag ccagagcagc tccaaatgttt tgagactctg gaagagatca caggttaccc 1260
atacatctca gcatggccgg acagcctgcc tgacctcagc gtcttccagc acctgcaagt 1320
aaatccgggaa cgaattctgc acaatggcgc ctactcgctg accctgcaag ggctggcat 1380
cagctggctg gggctgccc cactgaggaa actggcagt ggactggccc tcatccacca 1440
taacacccac ctctgcttcg tgcacacggc gcccctggac cagctcttc ggaacccgca 1500
ccaagctctg ctccacactg ccaaccggcc agaggacgag tgtgtggcg agggcctggc 1560
ctgccaccag ctgtgc当地 gaggacactg ctggggtcca gggccaccc agtgtgtcaa 1620
ctgcagccag ttccttc当地 gccaggagtg cgtggaggaa tgccgagttac tgcaaggggct 1680
ccccaggag tatgtgaatg ccaggcactg tttgccgtgc caccctgagt gtcagcccc 1740
gaatggctca gtgacactgtt ttggaccgga ggctgaccag tgtgtggcct gtgccacta 1800
taaggaccct cccttctgc当地 tggcccgctg ccccagcggc gtgaaacctg acctctccata 1860
catgcccatc tggaaatttc cagatgagga gggcgc当地 cagccttgcc ccatcaactg 1920
caccctcc tggatggacc tggatgacaa gggctgcccc gccgagcaga gagccagccc 1980
tctgacgtcc atcgtctctg cggtggttgg cattctgtgc gtcgtggct tgggggtgg 2040
cttgggatc ctcatcaagc gacggcagca gaagatccgg aagtaa 2086

<210> 11

<211> 2086

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 11

ccggggccgga gccgcaatga tcatcatgga gctggcggcc tgggtccgct gggggttcct 60
cctcgccctc ctgccccccg gaatcgcggg cacccaagtg tgtaccggca cagacatgaa 120
gttgcggctc cctgccagtc ctgagaccca cctggacatg ctccgccacc tgtaccagg 180
ctgtcaggta gtgcaggga acttggagct tacctacgtg cctgccaatg ccagcctctc 240
attcctgcag gacatccagg aagttcaggg ttacatgctc atcgctcaca accaggtgaa 300
gcgcgtccca ctgcaaaggc tgcgcatcgt gagagggacc cagctcttg aggacaagta 360
tgccctggct gtgctagaca accgagatcc tcaggacaat gtcgcgcct ccacccagg 420
cagaacccca gaggggctgc gggagctgca gttcgaagt ctcacagaga tcctggctag 480
cggaggggtc ttgatccagc ggaacccca gctctgctac caggacacga ttttgtggaa 540
ggacatcttc cacaagaaca accagctggc tctcacactg atagacacca accgctctcg 600
ggcctgccac ccctgttctc cgatgttaa ggctcccgc tgctgggag agagttctga 660
ggattgtcag agcctgacgc gcactgtctg tgccggtgcc tggcccgt gcaaggggcc 720
actgcccact gactgctgcc atgagcagtg tgctgcccgc tgacacggcc ccaagcactc 780
tgactgcctg gcctgcctcc acttcaacca cagtggcatc tgtgagctgc actgcccagc 840
cctggtcacc tacaacacag acacgttga gtccatgccc aatcccgagg gccggtatac 900
attcggcgcc agctgtgtga ctgcctgtcc ctacaactac ctttctacgg acgtgggatc 960
ctgcaccctc gtctgcccc tgcacaacca agaggtgaca gcagaggatg gaacacagcg 1020
gtgtgagaag tgcagcaagc cctgtcccc agtgtctat ggtctggca tggagcactt 1080
gcgagaggtg agggcagttt ccagtccaa tatccaggag tttgctggct gcaagaagat 1140
ctttgggagc ctggcatttc tgccggagag ctttgcgtgg gacccagcct ccaacactgc 1200
cccgctccag ccagagcagc tccaagtgtt tgagactctg gaagagatca caggttacct 1260
atacatctca gcatggccgg acagcctgcc tgacctcagc gtctccaga acctgcaagt 1320
aatccgggga cgaattctgc acaatggcgc ctactcgctg accctgcaag ggctggcat 1380
cagctggctg gggctgcgt cactgaggaa actggcagt ggactggccc tcatccacca 1440
taacacccac ctctgcttcg tgcacacgg tgcctggac cagctcttc ggaacccgca 1500
ccaagctctg ctccacactg ccaacccggc agaggacgag tgtgtggcg agggcctggc 1560
ctgccaccag ctgtgcggcc gagggcactg ctggggtcca gggccacccc agtgtgtcaa 1620
ctgcagccag ttccctcggt gcccaggatg cgtggaggaa tgccgagtac tgcaggggct 1680
ccccagggag tatgtgaatg ccaggcactg tttgcccgtc caccctgagt gtcagccca 1740
aatggctca gtgacctgtt ttggaccgga ggctgaccag tgtgtggcct gtgcccacta 1800
taaggaccct cccttctgcg tggcccgctg ccccagcggt gtgaaacctg acctctccct 1860

catgccatc tggaagttc cagatgagga gggcgatgc cagccttgc ccatcaactg 1920
cacccactcc tgtgtggacc tggatgacaa gggctgcccc gccgagcaga gagccagccc 1980
tctgacgtcc atcgctctg cgggtggttgg cattctgctg gtcgtggtct tgggggtgg 2040
ctttgggatc ctcatcaagc gacggcagca gaagatccgg aagtaa 2086

<210> 12

<211> 2086

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 12
ccggggccgga gccgcaatga tcatcatgga gctggcggcc tggtgccgct gggggttcct 60
cctcgccctc ctgccccccg gaatcgccgg cacccaagtg tgtaccggca cagacatgaa 120
gttgcggctc cctgcccagtc ctgagaccca cctggacatg ctccgccacc tgtaccagg 180
ctgtcaggta gtgcagggca acttggagct tacctacgtg cctgccaatg ccagcctctc 240
attcctgcag gacatccagg aagttcaggg ttacatgctc atcgctcaca accaggtgaa 300
gcgcgtccca ctgcaaaggc tgcgcatcgt gagagggacc cagcttttg aggacaagta 360
tgccctggct gtgctagaca accgagatcc tcaggacaat gtcgcccct ccacccagg 420
cagaacccca gaggggctgc gggagctgca gcttcgaagt ctcacagaga tcctgaaggg 480
aggagtttg atccgtggga accctcagct ctgctaccag gacatggtt tgtggaagga 540
cgtcttccgc aagaataacc aactggctcc tgtcgatata gacaccaatc gttcccggc 600
ctgtccacct tgtgccccccg cctgcaaaga caatcactgt tgggtgaga gtccggaaga 660
ctgtcagatc ttgactggca ccatctgtac cagtggttgt gcccggtgca agggcgctag 720
cctgcccact gactgctgcc atgagcagtg tgctgccggc tgcacgggcc ccaagcactc 780
tgactgcctg gcctgcctcc acttcaacca cagtggcatc tgtgagctgc actgcccagc 840
cctggtcacc tacaacacag acacgttga gtccatgccc aatcccagg gccggtatac 900
attcggcgcc agctgtgtga ctgcctgtcc ctacaactac ctttctacgg acgtgggatc 960
ctgcaccctc gtctgcccccc tgcacaacca agaggtgaca gcagaggatg gaacacagcg 1020
gtgtgagaag tgcagcaagc cctgtgccccg agtgtgctat ggtctggca tggagcactt 1080
gcgagaggtg agggcagtta ccagtgc当地 tatccaggag tttgctggct gcaagaagat 1140
ctttgggagc ctggcatttc tgccggagag ctttgc当地 gacccagcct ccaacactgc 1200
cccgctccag ccagagcagc tccaagtgtt tgagactctg gaagagatca caggttacct 1260
atacatctca gcatggccgg acagcctgcc tgacctcagc gtcttccaga acctgcaagt 1320

aatccgggga cgaattctgc acaatggcgc ctactcgctg accctgcaag ggctggcat 1380
cagctggctg gggctgcgct cactgaggga actggcagt ggactggccc tcatccacca 1440
taacacccac ctctgcttcg tgcacacggc gcccctggac cagctcttc ggaacccgca 1500
ccaagctctg ctccacactg ccaaccggcc agaggacgag tgtgtggcg agggcctggc 1560
ctgccaccag ctgtgcgccc gagggcactg ctggggtcca gggcccaccc agtgtgtcaa 1620
ctgcagccag ttcccttcggg gccaggagtg cgtggaggaa tgccgagtac tgcagggct 1680
ccccagggag tatgtgaatg ccaggcactg tttgccgtgc caccctgagt gtcagccca 1740
gaatggctca gtgacctgtt ttggaccgga ggctgaccag tgtgtggct gtgcccacta 1800
taaggaccct cccttctgcg tggcccgctg ccccagcggt gtgaaacctg acctctcccta 1860
catgcccatc tggaagtttc cagatgagga gggcgcatgc cagccttgc ccatcaactg 1920
caccactcc tgtgtggacc tggatgacaa gggctgccc gccgägcaga gagccagccc 1980
tctgacgtcc atcgctctg cggtggttgg cattctgctg gtcgtggct tgggggttgt 2040
ctttggatc ctcatcaagc gacggcagca gaagatccgg aagtaa

<210> 13

<211> 2086

<212> DNA

<213> human/rat



<400> 13
ccggggccgga gcccgaatga tcatcatgga gctggcggcc tggtgccgct gggggttcct 60
cctcgccctc ctgccccccg gaatcgccgg cacccaagtg tgtaccggca cagacatgaa 120
gttgcggctc cctgccagtc ctgagaccca cctggacatg ctccgccacc tgtaccagg 180
ctgtcaggtt gtgcagggca acttggagct tacctacgtg cctgc当地atg ccagcctctc 240
attcctgcag gacatccagg aagttcaggg ttacatgctc atcgctcaca accaggtgaa 300
gcgcgtccca ctgcaaaggc tgc当地atcgatg gagagggacc cagcttttggagg 360
tgccctggct gtgctagaca accgagatcc tcaggacaat gtc当地ccgcct ccacccagg 420
cagaacccca gaggggctgc gggagctgca gcttc当地atg ctc当地acagaga tcctgaaggg 480
aggagttttg atccgtggga accctcagct ctgctaccag gacatggttt tgtggaagga 540
cgtcttccgc aagaataacc aactggctcc tgtcgatata gacaccaatc gttcccggc 600
ctgtccaccc tggcccccggc cctgcaaaga caatcactgt tgggggtgaga gtccggaaaga 660
ctgtcagatc ttgactggca ccatctgtac cagtggttgt gcccggtgca agggccggct 720

gcccactgac	tgctgccatg	agcagtgtgc	cgcaggctgc	acggggccca	agcattctga	780
ctgcctggcc	tgcctccact	tcaatcatag	tggtatctgt	gagctgcact	gcccagccct	840
cgtcacctac	aacacagaca	ccttgagtc	catgcacaac	cctgagggtc	gctacacctt	900
tggtgccagc	tgcgtgacca	cctgccccta	caactacctg	tctacggaag	tgggagctag	960
ctgcaccctc	gtctgcccc	tgcacaacca	agaggtgaca	gcagaggatg	gaacacagcg	1020
gtgtgagaag	tgcagcaagc	cctgtgccc	agtgtgctat	ggtctggca	tggagcactt	1080
gcgagaggtg	agggcagtta	ccagtgccaa	tatccaggag	tttgcggct	gcaagaagat	1140
ctttgggagc	ctggcatttc	tgccggagag	ctttgatggg	gaccgcct	ccaacactgc	1200
cccgctccag	ccagagcagc	tccaaatgtt	ttagactctg	gaagagatca	caggttacct	1260
atacatctca	gcatggccgg	acagcctgcc	tgacctcagc	gtcttccaga	acctgcaagt	1320
aatccgggga	cgaattctgc	acaatggcgc	ctactcgctg	accctycaag	ggctgggcat	1380
cagctggctg	gggctgcgt	cactgaggg	actggcagt	ggactggccc	tcatccacca	1440
taacacccac	ctctgcttcg	tgcacacgg	gccctggac	cagcttttc	ggaacccgca	1500
ccaagctctg	ctccacactg	ccaaccggcc	agaggacgag	tgtgtggcg	agggcctggc	1560
ctgccaccag	ctgtgcgccc	gagggcactg	ctggggtcca	gggcccaccc	agtgtgtcaa	1620
ctgcagccag	tcccttcggg	gccaggagt	cgtggaggaa	tgccgagtac	tgcagggct	1680
ccccagggag	tatgtaatg	ccaggcactg	tttgcgtgc	caccctgagt	gtcagccca	1740
gaatggctca	gtgacctgtt	ttggaccgga	ggctgaccag	tgtgtggct	gtgcccacta	1800
taaggaccct	cccttctgcg	tggccgctg	ccccagcggt	gtgaaacctg	acctctccta	1860
catgcccatac	tggaagtttc	cagatgagga	ggcgcatgc	cagccttgcc	ccatcaactg	1920
cacccactcc	tgtgtggacc	tggatgacaa	gggctgccc	gcegagcaga	gagccagccc	1980
tctgacgtcc	atcgctctg	cggtggttgg	cattctgctg	gtcgtggct	tgggggtgg	2040
ctttgggatc	ctcatcaagc	gacggcagca	gaagatccgg	aagtaa		2086

<210> 14

<211> 2086

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 14

ccggggccgga	gccgcaatga	tcatcatgga	gctggcggcc	tggtgccgct	gggggttcct	60
cctcgccctc	ctgcccccc	gaatcgcg	ccccaagt	tgtaccggca	cagacatgaa	120

gttgcggctc	cctgccagtc	ctgagaccca	cctggacatg	ctccgccacc	tgtaccagg	180
ctgtcaggta	gtgcagggca	acttggagct	tacctacgtg	cctgccaatg	ccagcctctc	240
attcctgcag	gacatccagg	aagttcaggg	ttacatgctc	atcgctcaca	accaggtgaa	300
gcgctccca	ctgcaaaggc	tgcgcatcgt	gagagggacc	cagctcttg	aggacaagta	360
tgccctggct	gtgctagaca	accgagatcc	tcaggacaat	gtcgccgcct	ccaccccaagg	420
cagaaccca	gaggggctgc	gggagctgca	gcttcgaagt	ctcacagaga	tcctgaaggg	480
aggagtttg	atccgtggga	accctcagct	ctgctaccag	gacatggttt	tgtggaaagga	540
cgtctccgc	aagaataacc	aactggctcc	tgtcgatata	gacaccaatc	gttcccggc	600
ctgtccacct	tgtgcccccg	cctgcaaaga	caatcactgt	tggggtgaga	gtccggaaaga	660
ctgtcagatc	ttgactggca	ccatctgtac	cagtggttgt	gcccggtgca	agggccggct	720
gcccaactgac	tgctgcccatt	agcagtgtgc	cgcaggctgc	acggggccca	agcattctga	780
ctgcctggcc	tgcctccact	tcaatcatag	tggtatctgt	gagctgact	gcccagccct	840
cgtcacctac	aacacagaca	ccttgagtc	catgcacaac	cctgagggtc	gctacacctt	900
tggtgccagc	tgcgtgacca	cctgccccta	caactacctg	tctacggaag	tggatcctg	960
cactctggtg	tgtccccca	ataaccaaga	ggtcacagct	gaggacggaa	cacagcgttg	1020
tgagaaaatgc	agcaagccct	gtgctcgagt	gtgctatggt	ctgggcatgg	agcaccttcg	1080
aggggcgagg	gccatcacca	gtgacaatgt	ccaggagttt	gatggctgca	agaagatctt	1140
tgggagcctg	gcattttgc	cgagagagctt	tgatggggac	ccctccctccg	gcattgctag	1200
cccgctccag	ccagagcagc	tccaagtgtt	tgagactctg	gaagagatca	caggttacct	1260
atacatctca	gcatggccgg	acagcctgcc	tgacctcagc	gtttccaga	acctgcaagt	1320
aatccgggga	cgaattctgc	acaatggcgc	ctactcgctg	accctgcaag	ggctggcat	1380
cagctggctg	gggctgcgct	cactgaggg	actggcagt	ggactggccc	tcatccacca	1440
taacacccac	ctctgcttcg	tgcacacggt	gccttggac	cagcttttc	gaaacccgca	1500
ccaagctctg	ctccacactg	ccaaccggcc	agaggacgag	tgtgtggcg	agggcctggc	1560
ctgccaccag	ctgtgcgccc	gagggactg	ctggggtcca	gggcccaccc	agtgtgtcaa	1620
ctgcagccag	ttccttcggg	gccaggagtg	cgtggaggaa	tgccgagtac	tgcaggggct	1680
ccccagggag	tatgtaaatg	ccaggcactg	tttgcgtgc	caccctgagt	gtcagcccc	1740
gaatggctca	gtgacctgtt	ttggaccgga	ggctgaccag	tgtgtggct	gtgcccacta	1800
taaggacct	cccttctgcg	tggcccgctg	ccccagcggt	gtgaaacctg	acctctecta	1860
catgcccattc	tggaagtttc	cagatgagga	gggcgcattgc	cagcattgcc	ccatcaactg	1920
cacccactcc	tgtgtggacc	tggatgacaa	gggctgcccc	gccgagcaga	gagccagccc	1980

tctgacgtcc atcgctctcg cggtggttgg cattctgctg gtcgtggctc tgggggtgg 2040
ctttgggatc ctcatcaagc gacggcagca gaagatccgg aagtaa 2086

<210> 15

<211> 71

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 15

ccggaagtaa ataatcgacg ttcaaataat cgacgttcaa ataatcgacg ttcaaataat 60

cgacgttcaa t
<210> 16

71

<211> 71

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 16

ctagattgaa cgtcgattat ttgaacgtcg attatttgaa cgtcgattat ttgaacgtcg 60

attatttact t

71

<210> 17

<211> 71

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 17

ccggaagtaa ataatagagc ttcaaataat agagcttcaa ataatagagc ttcaaataat 60

agagcttcaa t

71

<210> 18

<211> 71

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 18

ctagattgaa gctctattat ttgaagctct attatttgaa gctctattat ttgaagctct 60
attatttact t 71

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 19

ctaggaagct tggtaactt gctagct 27

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 20

agcttagctag caagttaaac aagcttc

27

<210> 21

<211> 68

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 21

ctagataatc gacgttcaaa taatcgacgt tcaaataatc gacgttcaaa taatcgacgt

60

tcaagttt

68

<210> 22

<211> 64

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 22

aaacttgaac gtcgattatt tgaacgtcga ttatgttgaac gtcgattatt tgaacgtcga

60

ttat

64



<210> 23

<211> 68

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 23

ctagataata gagcttcaaa taatagagct tcaaataata gagcttcaaa taatagagct 60
tcaagttt 68

<210> 24

<211> 64

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 24

aaacttgaag ctctattatt tgaagctcta ttatttgaag ctctattatt tgaagctcta 60
ttat 64

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 25

taatacgact cactataggg 20

<210> 26

<211> 32

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 26

ggccggttac ccgcgattcc ggggggcagg ag 32

<210> 27

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 27

ccggctagct agcctgtcct tcctgcagga tatcc

35

<210> 28

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 28

ccggctagct agcggagggg tcttgatcca gcgga

35

<210> 29

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 29

ccggctagct agcctgcccc ctgactgctg ccatg

35

<210> 30

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 30

ccggctagct agctgcaccc tcgtctgccc cctgc

35

<210> 31

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 31
ccggctagct agcccgctcc agccagagca gctcc. 35

<210> 32

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 32
ccggctagct agcaaacaccc acctctgctt cgtgc 35

<210> 33

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 33
ccggctagct agccccaggg agtatgtgaa tgcca 35

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 34

tagaaggcac agtcgaggct 20

<210> 35

<211> 43

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 35

ccggctagct agccgcatt ccggggggca ggagggcgag gag 43

<210> 36

<211> 69

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 36
ctaggcatca tcatcatcat cataatggtc ataccgtga acaaaaactc atctcagaag 60
aggatctgg 69

<210> 37

<211> 69

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 37

ctagccagat cctcttctga gatgagttt tggcacccggtatgaccatt atgatgtga 60
tgatgatgc 69

<210> 38

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 38

ccggctagct agcgctggca ttggcaggca cgtag

35

<210> 39

<211> 35

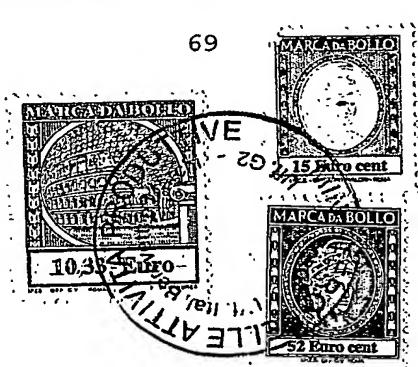
<212> DNA

<213> human/rat

<400> 39

ccggctagct agccaggatc tctgtgagac ttca

35



<210> 40

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 40

ccggctagct agcgcccttg caccgggcac aacca

35

<210> 41

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 41

ccggctagct agctcccaact tccgtagaca ggtag

35

<210> 42

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 42

ccggctagct agcaatgccg gaggaggggt cccca

35

RIVENDICAZIONI

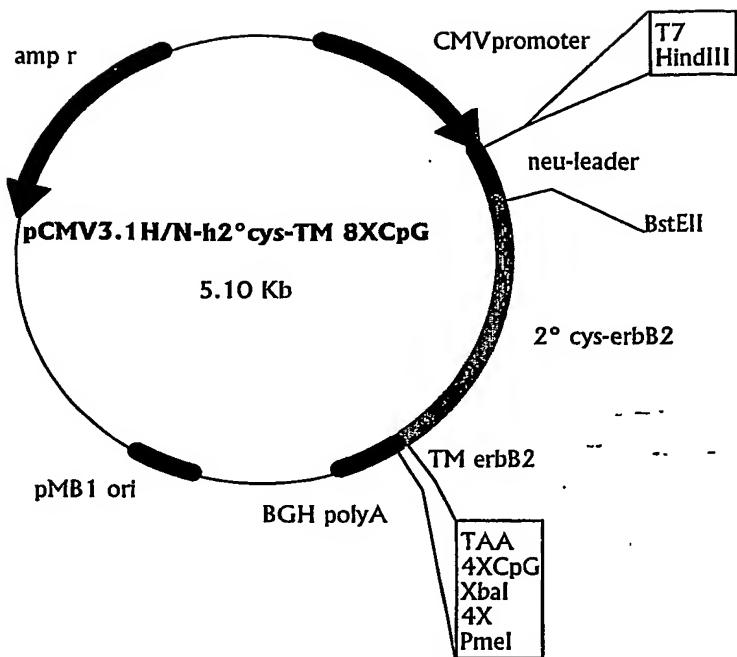
1. Un plasmide contenente una sequenza codificante un frammento di p185^{neu} scelta dal gruppo comprendente SEQ ID N. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14.
2. Plasmide secondo la rivendicazione 1, contenente inoltre un promotore della trascrizione.
3. Plasmide secondo la rivendicazione 2, dove detto promotore è CMV.
4. Plasmide secondo la rivendicazione 1, contenente inoltre almeno 4 motivi CpG.
5. Plasmide secondo la rivendicazione 4, contenente almeno 8 motivi CpG.
6. Composizione farmaceutica contenente un plasmide secondo le rivendicazioni 1-5 insieme a veicoli ed eccipienti farmaceuticamente accettabili.
7. Composizione secondo la rivendicazione 6, idonea alla somministrazione parenterale.
8. Composizione secondo la rivendicazione 7, in forma di soluzione iniettabile.
9. Uso di un plasmide secondo le rivendicazioni 1-5 per preparare una composizione farmaceutica da utilizzare nel trattamento preventivo o terapeutico di soggetti a rischio di sviluppo di tumori p185^{neu} positivi, o di pazienti portatori di tumori primari, metastasi o recidive di tumori p185^{neu} positivi.
10. Uso secondo la rivendicazione 9, per la preparazione di un vaccino a DNA.

Milano, 9 Ottobre 2003

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.



FIGURA 1



2003/0019421

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

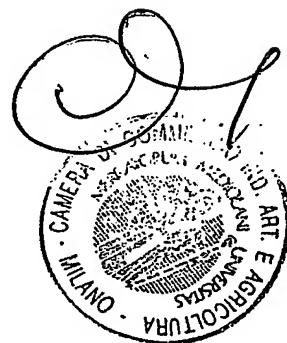
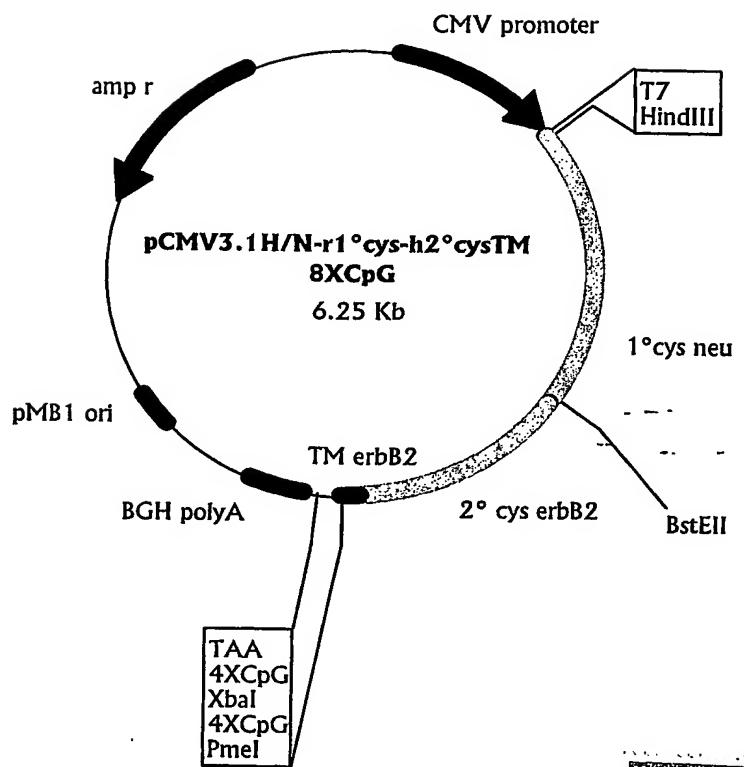


FIGURA 2

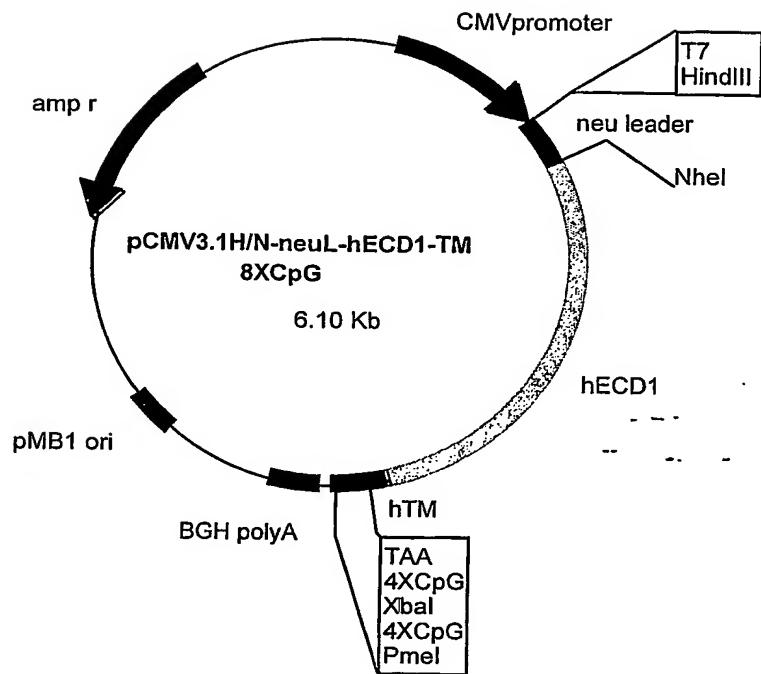


MI 2003A0019421

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.



FIGURA 3



MI 2003 A 0019421

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

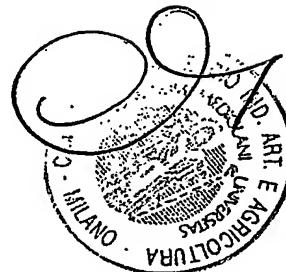
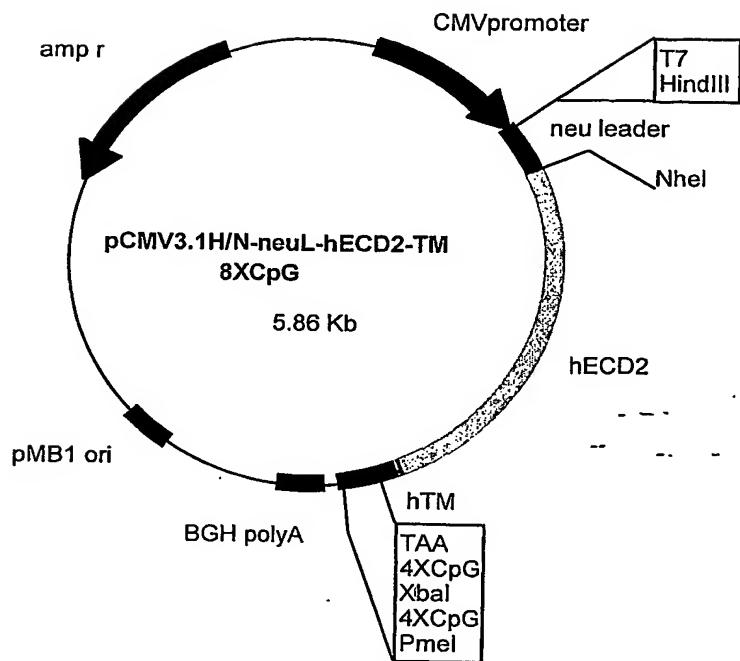


FIGURA 4



MI 2003 10019421

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

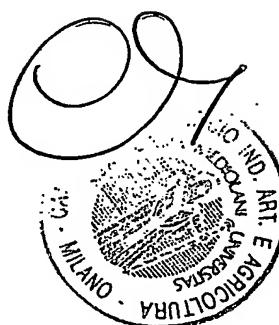
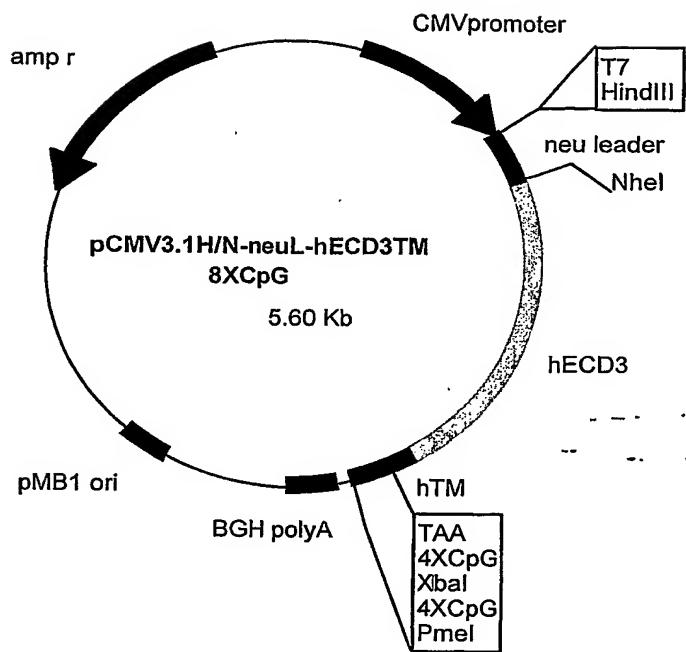


FIGURA 5



2003/001942

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Paolo

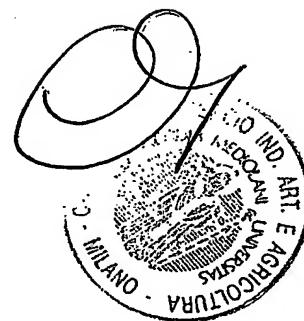
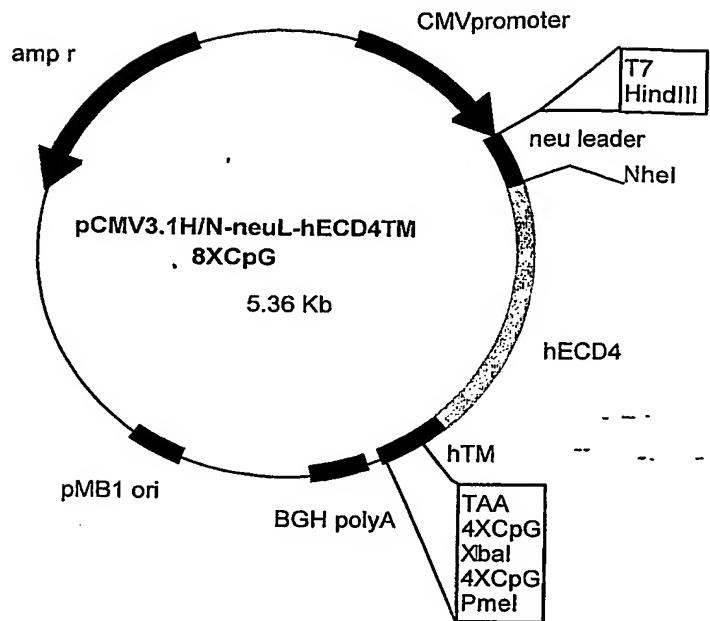


FIGURA 6



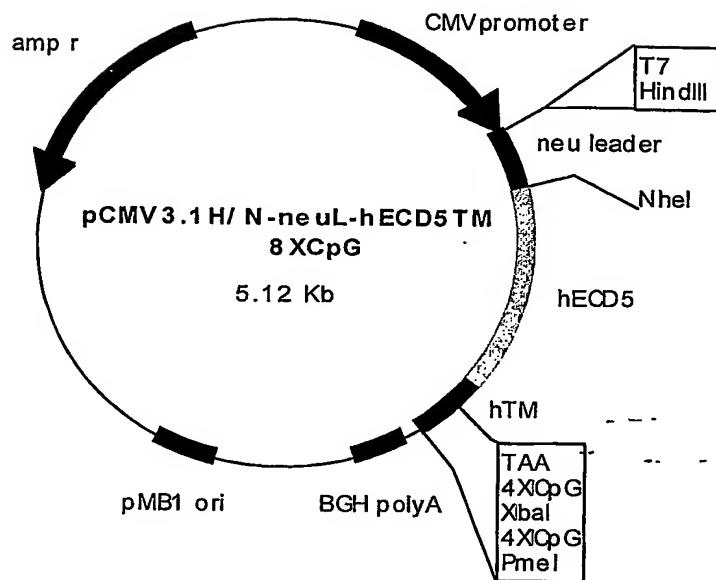
MI 2003 A 001942

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

(Signature)



FIGURA 7



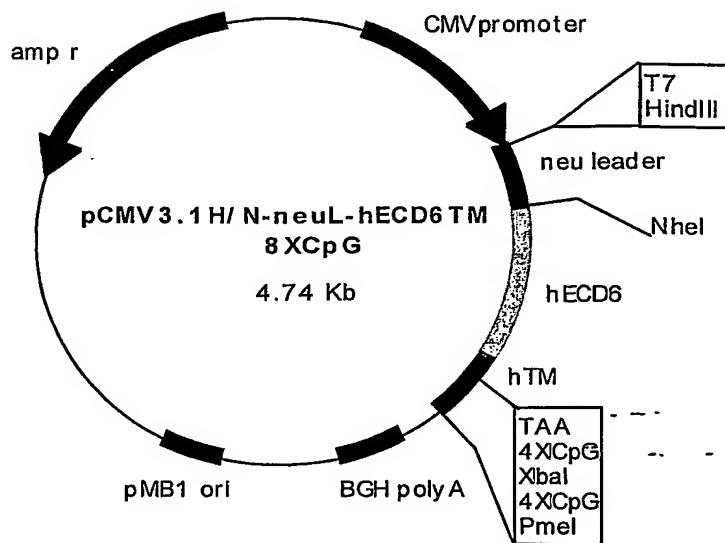
MI 2003 A 0019421

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Paolo



FIGURA 8



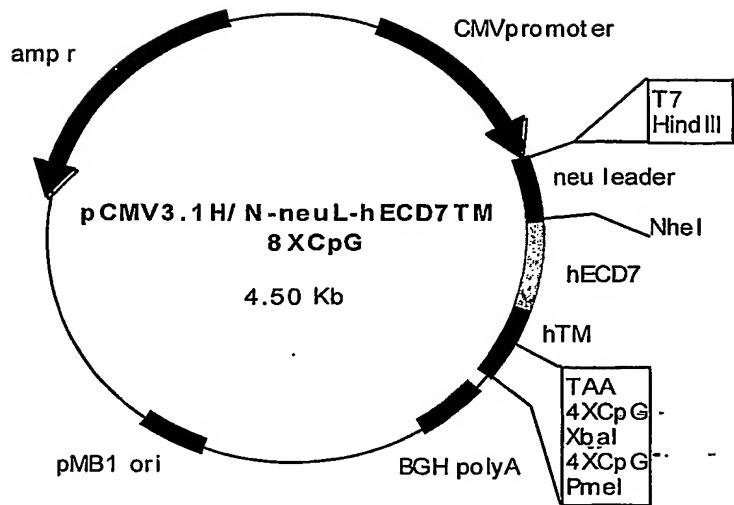
MI 2003/001942

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

(Signature)



FIGURA 9



2003A0019421

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Bracco M.

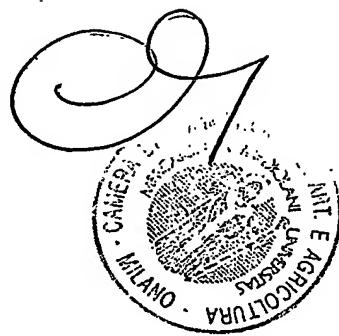
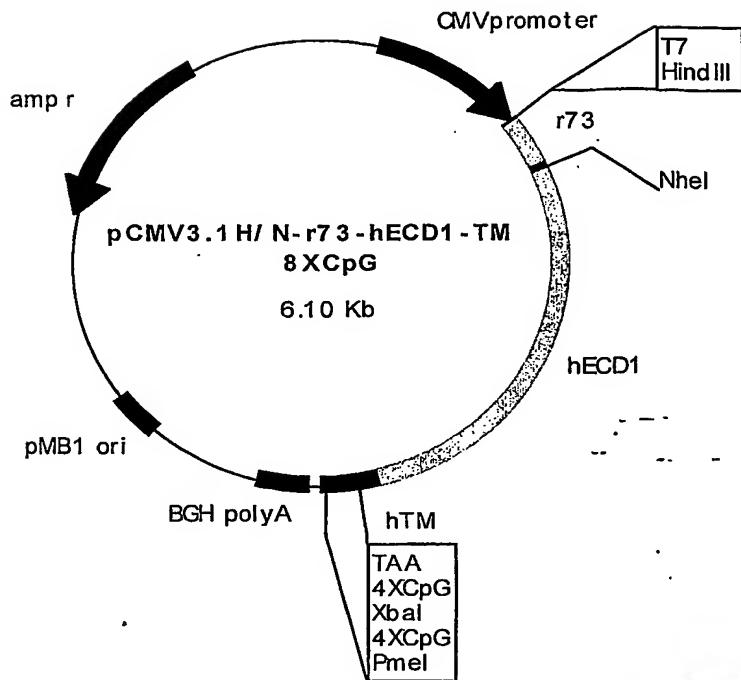


FIGURA 10

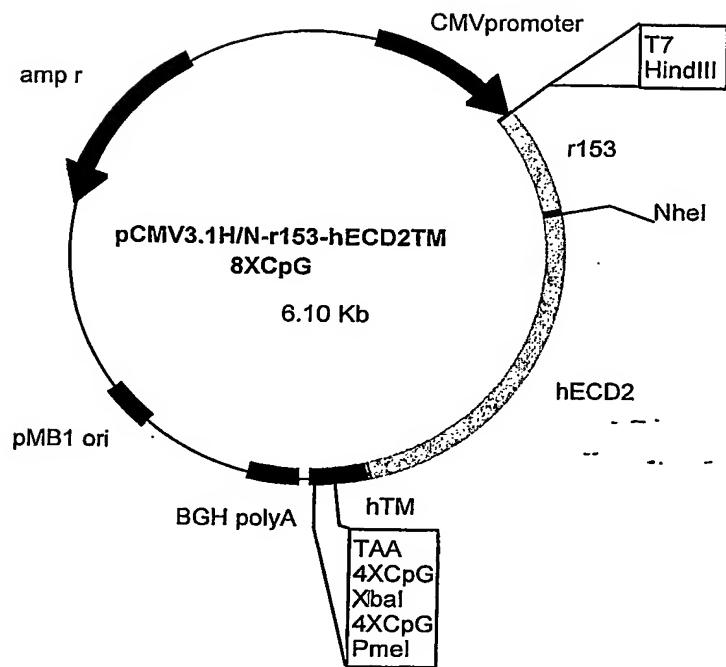


2003-01-19 42

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.



FIGURA 11



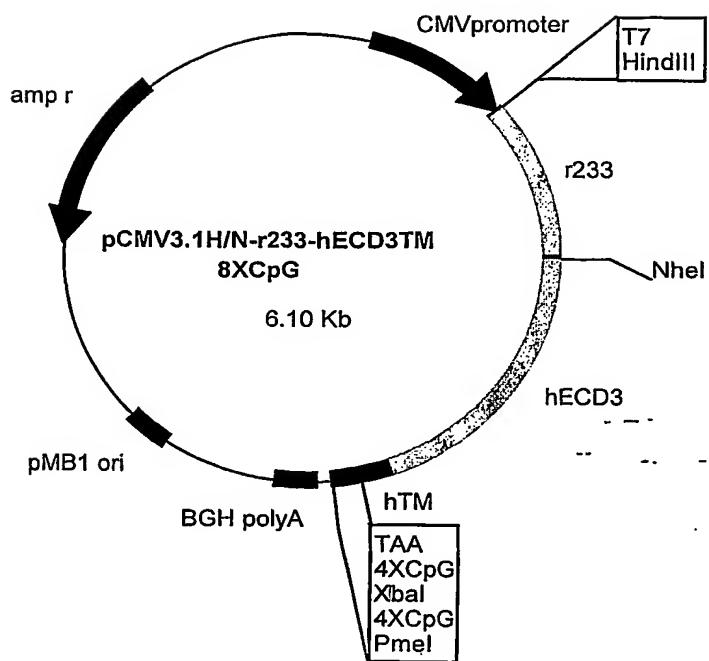
MI 2003 A 0019421

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Paolo



FIGURA 12



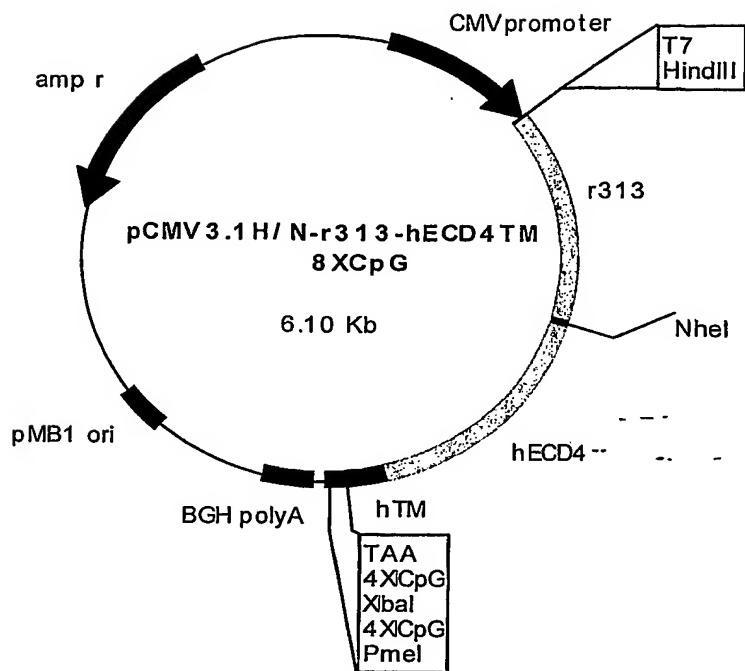
MI 2003A0019421

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Reed



FIGURA 13



2003 A 0019421

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Paolo Banfi

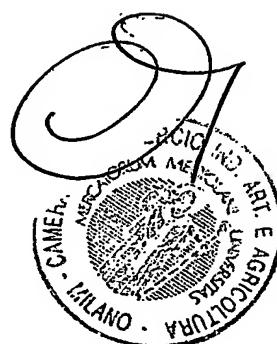
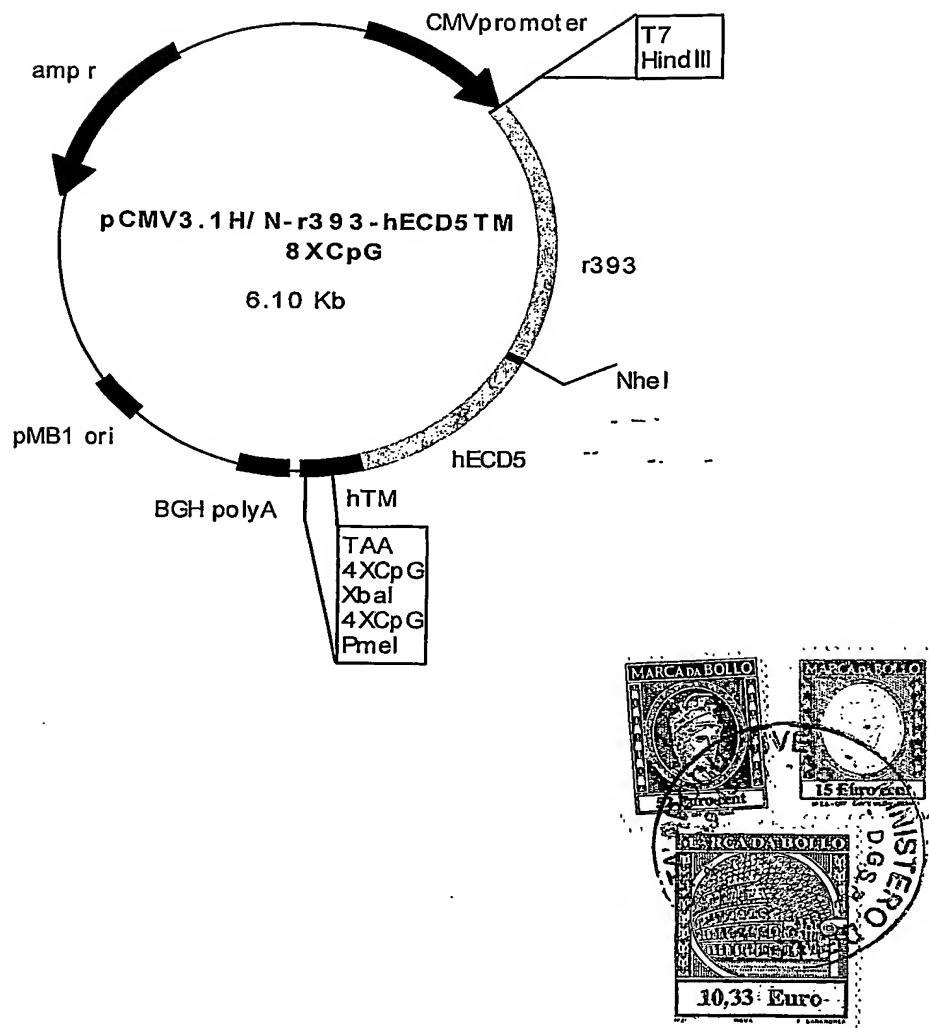


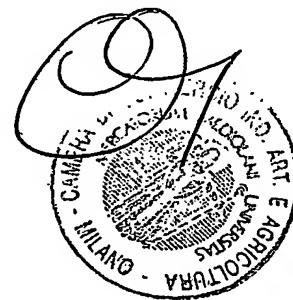
FIGURA 14



2003/001942

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Paolo



Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/011161

International filing date: 06 October 2004 (06.10.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT
Number: MI2003A 001942
Filing date: 09 October 2003 (09.10.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 31 January 2005 (31.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.